

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA INFORMÁTICA

GRADO EN INGENIERÍA DE LA SALUD

MENCIÓN EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**Encapsulación de neuropéptidos mediante la técnica de
Electrospraying & Electrospinning coaxial**

**Neuropeptide encapsulation device by using
Electrospraying & Electrospinning coaxial technology**

Realizado por

Adrián Postigo Arrabal

Tutorizado por

Belén Gago Calderón

Co-tutorizado por

Carmelo Millón Peñuela

Departamento

**Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y
Educación Física Deportiva**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

MÁLAGA, Junio de 2017

Fecha de defensa: Julio de 2017

El secretario del Tribunal

Resumen

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura con permeabilidad selectiva que no permite el paso de multitud de sustancias al sistema nervioso central (SNC). Algunos neuropéptidos, como la galanina, y fármacos que se podrían usar para tratar desórdenes psiquiátricos, tales como depresión o ansiedad, exceden el tamaño umbral para rebasar la BHE y por ende, no consiguen llegar al SNC. Este trabajo de fin de grado muestra una relación de diversas alternativas para favorecer la entrada de fármacos en el SNC, destacando el uso de nanopartículas. Con el fin de proponer una solución a dicho problema, haciendo uso de estas nanopartículas, en el presente trabajo se diseña el proceso de obtención de partículas y cápsulas poliméricas, sintetizadas mediante la técnica de Electrospraying & Electrospinning coaxial, que encapsulan líquido cefalorraquídeo (LCR). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran la capacidad del ácido poliláctico (PLA) y de la policaprolactona (PCL) para formar partículas poliméricas del orden de micrómetros, así como la encapsulación de LCR.

Palabras clave: Barrera hematoencefálica, Neuropéptido, Sistemas de administración de fármacos, Sistema nervioso central, Galanina, Electrospraying, Electrospinning, Coaxial, Polímero, Encapsulación, Nanopartículas, Líquido cefalorraquídeo, Ácido poliláctico, Policaprolactona.

Abstract

The blood-brain barrier (BBB) is a selective permeability structure that doesn't allow the passage of many substances to the central nervous system (CNS). Some neuropeptides, such as galanine, and drugs that could be used to treat psychiatric disorders, such as depression or anxiety, exceed the threshold size to overcome the barrier and, as a consequence, can't reach the CNS. This final degree work provides a set of different alternatives to favor the entrance of drugs to the CNS, highlighting the use of nanoparticles. With the purpose of proposing a solution to the cited problem, using these nanoparticles, the development process of polymeric capsules and particles, synthesized by using of Electrospraying & Electrospinning coaxial technology, that encapsulate cerebrospinal fluid (CSF), is designed in this work. The results obtained from the present work show the ability of both polylactid acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) to form polymeric particles in the order of micrometers, as well as the encapsulation of CSF.

Keywords: Blood-brain barrier, Neuropeptide, Drug delivery systems, Central nervous system, Galanin, Electrospraying, Electrospinning, Coaxial, Polymer, Encapsulation, Nanoparticles, Cerebrospinal fluid, Polylactic acid, Polycaprolactone.

Agradecimientos

A mi familia por animarme a seguir cuando las fuerzas flaqueaban.

A Belén y Carmelo por darme la oportunidad de realizar este trabajo y ayudarme en el desarrollo del mismo.

A YFlow Sistemas y Desarrollos S.L por dejarme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A Inma y Antonia por trasmitirme su apoyo y enseñarme a trabajar en un laboratorio.

A Antonio y Miguel por ayudarme en todo lo que estaba en sus manos, y esos ratos de risas.

A Marta por ser una gran compañera y apoyarme en los días menos optimistas.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Introducción al trabajo	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Estructura de la memoria	3
2. Estado del arte	5
2.1. Metodología	5
2.2. La Barrera Hematoencefálica (BHE)	6
2.2.1. Funciones	7
2.2.2. Estructura y distribución	7
2.2.3. Permeabilidad	8
2.3. Neuropeptidos: Galanina	10
2.4. Administración de fármacos en el Sistema Nervioso Central (SNC)	12
2.4.1. Métodos invasivos	12
2.4.2. Métodos no invasivos	14
2.5. Electrospaying & Electrospinning coaxial	18
2.5.1. Fundamento: Microencapsulación	18
2.5.2. Antecedentes	18
2.5.3. Electrospinning	19
2.5.4. Electrospaying	20
2.5.5. Fundamento teórico Electrospaying/Electrospaying coaxial	22
3. Trabajo de laboratorio	25
3.1. Metodología	25
3.1.1. Materiales	25
3.1.2. Preparación de disoluciones	26
3.1.3. Maquinaria empleada	27
3.1.4. Detección de circularidad	28
3.1.5. Cálculo de la conductividad	28
3.1.6. Observación de muestras a microscopía	29
3.2. Generación de partículas	30
3.2.1. Experimentación	30
3.2.2. Discusión	35

3.3. Generación de cápsulas	36
3.3.1. Experimentación	36
3.3.2. Discusión	39
4. Conclusiones	41
5. Líneas futuras de trabajo	43
6. Bibliografía	45
Anexo I. Códigos de MATLAB	49

Capítulo 1

Introducción

1.1. Introducción al trabajo

El sistema nervioso central (SNC) requiere para su funcionamiento un aporte continuo de sustratos energéticos -fundamentalmente oxígeno y glucosa- que se suministran a través de una riquísima red de capilares sanguíneos, probablemente la red más compleja del organismo. No obstante, y aparentemente de forma paradójica, el medio interno del SNC se encuentra aislado de la circulación sanguínea por una estructura única en el cuerpo humano: la barrera hematoencefálica (BHE) (Pascual et al., 2003). Esta BHE constituye un impedimento para el paso de sustancias terapéuticas cuyas dianas se encuentran en la superficie de las neuronas o las células gliales.

Existen algunas terapias emergentes para salvar este obstáculo como son la terapia de reemplazamiento enzimático y terapia génica *ex vivo* e *in vivo* (Förster, 2008). Sin embargo, en los últimos años ha cobrado gran importancia la vía de administración de fármacos a través de la BHE basada en la nanotecnología. Especialmente, las técnicas basadas en la encapsulación de sustancias han demostrado cierta eficiencia en estudios *in vivo* y preclínicos (Pascual et al., 2003). La encapsulación es capaz de aportar una fuente de moléculas terapéuticas sintetizadas de *novo* y dirigidas hacia un objetivo, de modo que puedan ser distribuidas a lo largo de porciones significativas del cerebro (Wolburg and Lippoldt, 2002). A pesar de ser probablemente una técnica realmente efectiva para administrar fármacos a través de la BHE, no es la única. No obstante, para conocer con precisión la biotoxicidad de los materiales y conseguir su optimización y la estandarización para su uso, aún queda camino por recorrer.

Entre las sustancias que verían favorecida su administración como terapias farmacológicas mediante su encapsulación y administración intranasal se encuentran los neuropéptidos, que no pueden atravesar la BHE (Adrian et al., 1983). Estos péptidos de pequeño tamaño actúan como neurotransmisores en el SNC, modulando multitud de funciones. En este trabajo se analizará el neuropéptido Galanina (GAL). Se trata de un péptido que actúa como neurotransmisor y cuyos niveles se ven alterados en ciertas enfermedades y

desórdenes mentales. Para comprender su importancia, cabe destacar que la GAL aporta numerosos beneficios frente a las enfermedades neurodegenerativas, entre los cuales se encuentra su comportamiento como agente neuroprotector o inhibidor de la excitotoxicidad y la neuroinflamación. Sin embargo, encuentra dificultades a la hora de atravesar la BHE (Adrian et al., 1983).

Por todo lo anteriormente mencionado, resulta de gran interés explorar el desarrollo de cápsulas en las que introducir la GAL y así favorecer su administración eficiente en el SNC.

Este trabajo se llevará a cabo en colaboración con la empresa YFlow Sistemas y Desarrollos S.L, que ha desarrollado y patentado diversas técnicas de encapsulación, y con el laboratorio dirigido por Ignacio Loscertales en la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Málaga (UMA). Este trabajo de fin de grado se encuentra dentro del marco de un proyecto de innovación educativa financiado por la Universidad de Málaga. El título de dicho proyecto es “Blogs como herramienta para la tutorización de trabajos de fin de grado: directores docentes y profesionales (PIE 15-17)”. Mediante este proyecto, se hace uso de las TIC para facilitar la comunicación entre tutores y alumnos.

1.2. Objetivos

El objetivo principal de este TFG es conocer la estructura de la BHE para comprender su baja permeabilidad para múltiples sustancias como los neuropéptidos, con el fin de diseñar cápsulas usando la técnica de Electrospraying & Electrospinning coaxial con las que encapsular GAL diluida en líquido cefalorraquídeo (LCR).

Los objetivos específicos son:

- Realizar una revisión bibliográfica sistemática sobre la estructura y funcionalidad de la BHE.
- Revisar los materiales usados en trabajos previos para la generación de las cápsulas con nanopartículas.
- Conocer el estado del arte de la técnica de Electrospraying & Electrospinning coaxial.
- Desarrollo de partículas y cápsulas poliméricas para poder encapsular neuropéptidos como la GAL, diluidos en LCR.

1.3. Estructura de la memoria

La memoria del presente trabajo de fin de grado se encuentra dividida en cinco capítulos, un anexo y las referencias bibliográficas, siendo este primer capítulo el de **introducción** al trabajo que se lleva a cabo.

En el **capítulo 2, estado del arte**, se realiza una profunda búsqueda bibliográfica acerca de los conceptos fisiológicos que aborda este trabajo y un estudio de la tecnología de Electrospraying & Electrospinning coaxial.

El **capítulo 3, Trabajo de laboratorio**, presenta una relación de experimentos realizados para la obtención de partículas poliméricas por un lado y por otro, para la obtención de cápsulas. Se proveen resultados y discusión de cada proceso.

El **capítulo 4, conclusiones**, presenta un conjunto de conclusiones tomadas tras la realización del presente trabajo de fin de grado, en relación con los objetivos propuestos inicialmente.

El **capítulo 5, líneas futuras de trabajo**, presenta una serie de pautas de desarrollo futuras, identificadas tras la realización del trabajo.

El **Anexo I. Códigos MATLAB**, muestra los códigos de MATLAB implementados en la realización de experimentos complementarios en el presente trabajo.

Capítulo 2

Estado del arte

2.1. Metodología

Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de la literatura existente para determinar cuáles son las principales propiedades estructurales y funcionales que posee la BHE y conocer los posibles materiales que se podrían usar para la encapsulación de la GAL. También se ha realizado una búsqueda de información acerca de la técnica de electrospraying & Electrospinning coaxial.

La base de datos médica que se ha usado para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica ha sido Pubmed. Para la obtención de artículos en los que se describe los fundamentos de la técnica que se va a usar en este trabajo se ha utilizado la base de datos Google Scholar.

Para la búsqueda en Pubmed, se utilizaron los operadores lógicos AND y OR y las siguientes palabras claves, empleando distintas combinaciones entre ellas: blood brain barrier, galanin, permeability, tight junctions, drug delivery, brain delivery, nanomaterials, strategy, nanoparticles, materials. Las distintas combinaciones que se usaron fueron las siguientes:

- blood brain barrier AND neuropeptide.
- blood brain barrier AND drug delivery.
- blood brain barrier AND permeability.
- nanoparticles AND brain delivery.
- anxiety AND Galanin.
- stress disorder AND Galanin.
- Blood brain barrier OR permeability.
- blood brain barrier AND materials.

- **blood brain barrier AND GAL.**

Para la búsqueda en Google Scholar, se utilizaron los operadores lógicos AND y OR y las siguientes palabras clave, empleando distintas combinaciones entre ellas: electrospraying, electrospinning, drug delivery, cerebrospinal fluid, neuropeptide, nanoparticles. Las distintas combinaciones que se usaron fueron las siguientes:

- **Electrospraying AND Electrospinning.**
- **Electrospraying OR Electrospinning.**
- **Electrospraying OR drug delivery.**
- **Electrospraying AND cerebrospinal fluid.**
- **Electrospraying AND nanoparticles.**
- **Nanoparticles AND neuropeptide.**

Los criterios de inclusión empleados en la búsqueda en ambas bases de datos para determinar la bibliografía a usar han sido los siguientes:

- **Artículos de revisión científica.**
- **Textos en español e inglés.**
- **Textos desde el año 2007 hasta el 2017.**
- **Textos con las palabras claves incluidas en el título y en el resumen.** Se desecharon aquellos artículos que no se ajustaban a la finalidad del presente trabajo y aquellos a los que no se pudo acceder al texto completo.

2.2. La Barrera Hematoencefálica (BHE)

El concepto inicial de BHE surgió a finales del siglo XIX, cuando diversos investigadores observaron que la inyección intravenosa (IV) de un colorante teñía todo el organismo, excepto el cerebro y la médula espinal (Janzer, 1993). Por el contrario, al infundir el colorante en los ventrículos cerebrales, éste sí difundía dentro del parénquima cerebral y teñía todo el cerebro. El término concreto de BHE lo acuñó Lewandowsky en 1900, cuando describió que la inyección de un producto neurotóxico sólo tenía un efecto nocivo si se realizaba dentro del parénquima cerebral, mientras que la inyección IV del mismo producto resultaba inocua (Jain, 2013).

2.2.1. Funciones

Las principales funciones de la BHE son las siguientes:

- **Protección.** La barrera hematoencefálica funciona como escudo ante compuestos y moléculas circulantes en la corriente sanguínea, gracias a las uniones estrechas del endotelio de los capilares cerebrales, lo que permite que únicamente un pequeño grupo de moléculas esenciales crucen la barrera, entre las que se encuentran el oxígeno, la glucosa, los aminoácidos y otros nutrientes esenciales (Ballabh et al., 2004).
- **Transporte.** Transporte selectivo desde la red capilar al parénquima cerebral, por medio de transporte facilitado como ocurre con la glucosa, o bien por transporte activo, es decir, dependiente de adenosín trifosfato (ATP) (Ballabh et al., 2004).
- **Metabolismo.** La barrera hematoencefálica metaboliza o modifica elementos, tanto en el SNC como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Ballabh et al., 2004).

2.2.2. Estructura y distribución

De sus funciones se desprende que la BHE es una barrera de transporte estructural y bioquímica, altamente especializada, que consta de vasos formados por células endoteliales, conectadas por uniones estrechas, que están rodeadas por prolongaciones (pies) de los astrocitos. Consiste en una barrera de difusión que impide la afluencia de la mayoría de los compuestos de la sangre al cerebro (Ballabh et al., 2004), ya que el mantenimiento del frágil microambiente extracelular en el parénquima neuronal es esencial para un correcto funcionamiento del SNC. La BHE es, por tanto, la estructura responsable de proteger este entorno frente a productos químicos nocivos y variaciones en la composición de la sangre.

La BHE consta de células endoteliales (CE) capilares, aunque también de otras células, como los pericitos (células contráctiles) y los astrocitos (células gliales), que desempeñan un papel importante en la diferenciación y el mantenimiento de la función de la BHE (Figura 2.1). Las CE de los capilares del cerebro se distinguen de los de la periferia por la presencia de uniones estrechas continuas por la falta, casi total, de pinocitosis, y porque tienen dos membranas plasmáticas en serie que forman un endotelio continuo (Brasnjevic et al., 2009). Además, estas células endoteliales tienen una carga superficial negativa, que repele los compuestos cargados negativamente, y poseen muchas mitocondrias, enzimas y varios sistemas para el transporte activo selectivo de nutrientes y otras sustancias (Abbott et al., 2006; Broadwell et al., 1996). Las CE están rodeadas por una membrana basal, una matriz extracelular y pericitos, así como por terminaciones de los astrocitos que cubren más del 90 % de la superficie de las células endoteliales y que intervienen en la permeabilidad de la BHE.

A pesar de que la BHE está distribuida por todo el SNC, en el cerebro hay áreas desprovistas de esta barrera, estando la mayoría alrededor de los ventrículos cerebrales, lo

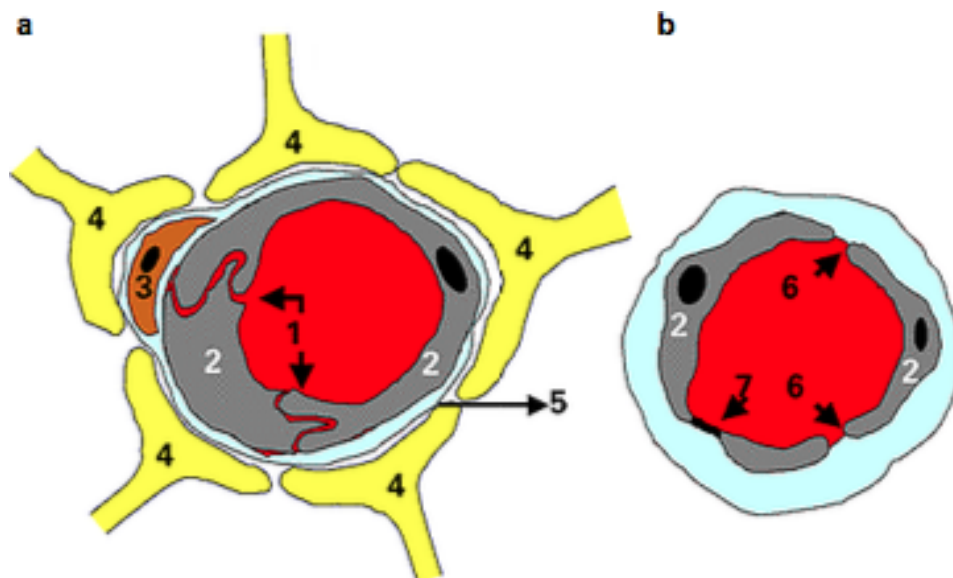


Figura 2.1: Esquema comparativo de la estructura de la pared de un capilar cerebral con barrera hematoencefálica (a) frente a un capilar sin barrera (b). Leyenda: 1.Uniones estrechas; 2.Célula endotelial; 3.Pericito; 4.Pie astrocitario pericapilar; 5.Lámina basal subendotelial; 6.Hendidura interendotelial; 7.Fenestración intraendotelial. (Pascual et al., 2003)

que justifica la designación de órganos circunventriculares: los plexos coroideos, el órgano vasculoso de la lámina terminal, el órgano subfornical, el órgano subcomisural, la eminencia media, la glándula pineal, la neurohipófisis y el área postrema. Esas áreas, sin BHE, permiten el libre intercambio bidireccional de moléculas sanguíneas con las neuronas del parénquima cerebral adyacente y contribuyen a regular el sistema nervioso autónomo y las glándulas endocrinas por el paso de hormonas (Janzer, 1993).

2.2.3. Permeabilidad

La necesidad de aislar el tejido nervioso de la sangre parece ser, casi desde el principio de la evolución de la vida animal, un requisito imprescindible para el correcto funcionamiento del SNC (Pascual et al., 2003). Así, la propiedad principal de la BHE es la permeabilidad altamente restringida del endotelio vascular del SNC al paso de solutos plasmáticos como el agua, gases como el O_2 y el CO_2 y determinadas moléculas liposolubles muy pequeñas (menores de 400-600 Da de peso molecular). Por esto, las moléculas orgánicas no pueden atravesar libremente este endotelio, sino que deben hacerlo a través de sistemas de transporte específicos y finamente regulados (Pascual et al., 2003).

Con el desarrollo de la microscopía electrónica, pudo identificarse cuál era el elemento clave que determinaba la propiedad de barrera: las CE (Pascual et al., 2003). Estas células de los vasos sanguíneos en el encéfalo y la médula espinal comparten una serie de

características morfológicas y funcionales que explican la propiedad del aislamiento del tejido nervioso de la sangre. Entre ellas, las más destacables son (Pascual et al., 2003):

1. La existencia de un sellado intercelular del endotelio por medio exclusivamente de uniones estrechas (Figura 2.1), que son de mayor complejidad que en el resto de los epitelios y que impiden cualquier comunicación directa entre los espacios IV y extracelular cerebral (Förster, 2008). Las uniones estrechas constituyen unas ‘interdigitaciones’ entre las membranas de CE adyacentes que incrementan la resistencia eléctrica intercelular y que además, permiten diferenciar funcionalmente las membranas luminal y abluminal de las CE, que contienen diferentes mecanismos de transporte específicos para cada molécula y por tanto, presentan diferente permeabilidad (Pascual et al., 2003). Las uniones estrechas están formadas fundamentalmente por tres proteínas transmembranales: ocludina, claudina y moléculas de adhesión intercelular (MAI).
2. La ausencia de fenestraciones en las CE, excepto en los vasos de las áreas cerebrales sin BHE. Estas fenestraciones (Figura 2.1) son estructuras celulares a modo de ‘perforaciones’ o discontinuidades citoplasmáticas recubiertas de membrana, con una estructura de diafragma que regula qué tipo de moléculas pueden atravesar directamente la célula, en base a su tamaño y polaridad (Pascual et al., 2003).
3. La carencia de vesículas de endocitosis en comparación con el elevado número de vesículas observable en el endotelio de otros órganos (Pascual et al., 2003). Mediante dichas vesículas, las células internalizan moléculas solubles a partir de una invaginación de la membrana celular (endocitosis). En el endotelio con BHE, esta vía de comunicación directa transcelular entre los espacios intraventricular y extracelular está muy limitada y predomina la endocitosis mediada por receptores. Sin embargo, recientemente, sí se ha identificado una vía transcelular para las proteínas de alto peso molecular (Pascual et al., 2003).
4. El elevado número relativo de mitocondrias por CE, que indica una actividad metabólica superior a la de otros endotelios, probablemente relacionada con el mayor número y actividad de los sistemas de transporte activo transmembrana (Broadwell et al., 1996).
5. La existencia de una lámina basal simple, y no doble como la de los capilares fenestrados, que rellena el estrecho espacio pericapilar entre el endotelio y los pies gliales. En las arteriolas, esta lámina basal se hace doble cuando cubre la membrana de los pericitos. Las células periarteriolas presentan propiedades contráctiles similares a las de las células musculares lisas (Pascual et al., 2003).
6. La existencia de la glicoproteína P (P-gp) en la membrana de las CE. Esta proteína transmembrana de 170 kDa pertenece a la familia de los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC) con alta especificidad por sustratos y es uno de los principales responsables de mantener la integridad y la estructura de la

BHE. En las CE, la P-gp se localiza en la membrana luminal, que es la membrana orientada hacia la luz del vaso sanguíneo, lo que facilita el transporte de manera unidireccional. La función fisiológica de la P-gp es la de proteger el organismo de compuestos xenobióticos mediante el uso de moléculas citotóxicas en los espacios lumbinales, para su eliminación. (Azad et al., 2015).

Las moléculas pequeñas atraviesan generalmente la BHE en cantidades farmacológicamente significativas si se cumplen las siguientes circunstancias: 1) La masa molecular del fármaco es menor de 400-500 Da; de hecho, el peso molecular medio de los fármacos que acceden al SNC es de 357 Da (Abbott et al., 2006); 2) el fármaco forma menos de 8-10 enlaces de hidrógeno con el agua.

Existen otros aspectos a tener en cuenta. La permeabilidad de la BHE disminuye 100 veces cuando el área superficial del fármaco se incrementa desde 52 (por ejemplo, un fármaco con masa molecular de 200 Da) hasta 105 (por ejemplo, un fármaco de 450 Da). La difusión del fármaco a través de una membrana biológica no es análoga a la difusión de éste a través de un disolvente como agua, pues a través de una membrana biológica es dependiente del volumen del fármaco que se quiere introducir (Pardridge, 2005).

Diversos estudios han demostrado que el uso de ciertas nanopartículas mejorarán el rendimiento de la administración de agentes terapéuticos para que lleguen a sus dianas en el cerebro (Shilo et al., 2015). Sin embargo, es complicado establecer unos principios en base a estos estudios debido a las diferencias de material empleado, tamaño, forma o sitio diana. No obstante, algunos estudios han empleado la probabilidad para estimar el tamaño de las partículas que acaban cruzando la BHE. Un ejemplo son las nanopartículas de oro (Shilo et al., 2015), que se sintetizaron en un rango de distintos tamaños que iba desde 20nm hasta 110 nm y se demostró que las partículas con un tamaño alrededor de los 50 nm consiguieron entrar al medio del sistema nervioso central salvando el obstáculo de la BHE (Shilo et al., 2015), aunque otro estudio mostró que las que mejor rendimiento tuvieron fueron las partículas con tamaños alrededor de los 20 nm (Trono et al., 2011).

2.3. Neuropéptidos: Galanina

Los neuropéptidos, que son proteínas de pequeño tamaño, son producidos y liberados por las neuronas mediante secreción regulada y que funcionan como transmisores (Burbach, 2011). Entre los neuropéptidos sintetizados por el SNC y SNP se encuentra la GAL, que fue aislada por primera vez en 1983 en el intestino de cerdo. Desde entonces, ha sido aislada en múltiples especies, incluyendo la rata, el ratón o el ser humano (Lundström et al., 2005).

Este péptido consta de 29-30 aminoácidos donde el extremo-N terminal ha sido identificado como parte crucial en su actividad biológica (Lundström et al., 2005). Su expresión es altamente inducible, mostrando una regulación positiva tras alteraciones patológicas

en el sistema nervioso (Lundström et al., 2005). Así, se observa un significativo aumento en la expresión de la GAL después de una lesión en el nervio periférico, en la parte basal posterior del cerebro en la enfermedad del Alzheimer, durante el desarrollo neuronal y después de la estimulación con estrógenos, mientras que la actividad convulsiva agota la GAL en el hipocampo.

La GAL ejerce sus funciones a través de su interacción con tres receptores asociados a la proteína G, que son el GalR1, GalR2 y GalR3 (Holmes and Picciotto, 2006), actuando predominantemente como un neuromodulador inhibitor e hiperpolarizante. En el sistema nervioso, la GAL y sus receptores tienen una amplia distribución en el SNC (ver tabla 2.1), a menudo coexpresándose con otros neurotransmisores y neuromoduladores.

Este neuropéptido regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Así mismo, está implicado en varias funciones fisiológicas de orden superior, incluyendo cognición, alimentación o regulación del estado de ánimo. Diversos estudios, además, involucran a la GAL en el desarrollo de diversos trastornos como la depresión y la ansiedad (Millón Peñuela, 2015). La depresión y la ansiedad derivada del estrés son desórdenes muy incapacitantes.

Tabla 2.1: Distribución de la galanina y de los subtipos de receptores de galanina. BNST *Bed nucleus of the stria terminalis*; DRN Núcleo dorsal del rafe; LC *Locus coeruleus*; DRG grupo dorsal respiratorio; GalR Receptor de galanina; NA no aplicable (Mitsukawa et al., 2008)

	Galanina	GalR1	GalR2	GalR3
BNST	+++	+++	++	+/ 0
Amígdala	+++	+++	++	+/ 0
Hipocampo	+	++	++	+/ 0
Hipotálamo	+++	+++	++	+
DRN	+	++	++	+/ 0
LC	+++	+++	++	+/ 0
Médula espinal	++	++	++	+/ 0
DRG	++	+++	+++	+/ 0
Páncreas	+	+++	++	NA
Tumores sólidos	++	+++	++	NA

Ante la ineficacia de las farmacoterapias existentes en un elevado porcentaje de pacientes, en los últimos años ha habido un gran auge en el desarrollo de antidepresivos y de la investigación en el papel de los neuropéptidos, incluyendo la GAL. Se han llevado a cabo investigaciones en las que se comparan las regiones cerebrales post mortem de los pacientes suicidas deprimidos (Barde et al., 2016). Diversos experimentos realizados para confirmar el papel de la GAL en la depresión mostraron una interacción entre la GAL y el sistema serotoninérgico (Millón Peñuela, 2015).

Por otro lado, se han hallado hechos que confirman el papel del GALR3 en el trastorno depresivo, lo que lo convierte en un posible objetivo farmacológico para esta enfermedad (Holmes and Picciotto, 2006). Los efectos producidos por la GAL en la ansiedad pueden ser explicados, en parte, por la acción y distribución diferencial de sus receptores (Mitsukawa et al., 2008).

El medio en el que se encuentra la GAL en el cuerpo humano es el líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR es un fluido que se encuentra contenido en los ventrículos y en los espacios subaracnoideos del cerebro. El volumen medio de LCR es de 150 ml, 25 ml en los ventrículos y 125 ml en los espacios subaracnoideos (Sakka et al., 2011).

2.4. Administración de fármacos en el Sistema Nervioso Central (SNC)

En este apartado se van a tratar las distintas vías de administración de fármacos en el cerebro, realizando una distinción entre métodos que alteran el estado normal del organismo diana (métodos invasivos), y métodos que resultan inocuos (métodos no invasivos). En la figura 2.2 se ilustra un esquema:

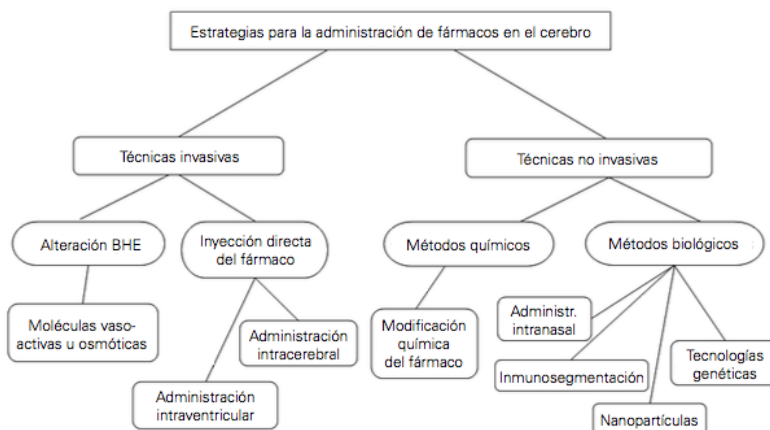


Figura 2.2: Representación esquemática de posibles estrategias para la administración de fármacos para su acción en el cerebro (de Boer and Gaillard, 2006).

2.4.1. Métodos invasivos

Una pregunta esencial que surge a la hora de discutir y considerar los distintos métodos que existen para traspasar la BHE es si se trata de un proceso potencialmente peligroso. El hecho de que la BHE impida que muchos tipos diferentes de moléculas y fármacos entren al cerebro, desde la vasculatura, sugiere que la gran permeabilidad de la BHE es perjudicial (de Boer and Gaillard, 2006).

Alteración de la BHE

La solución hiperosmótica, desarrollada por Neuwelt, fue una de las primeras soluciones que se utilizaron en seres humanos para este fin. Esta técnica todavía se usa en la práctica clínica diaria para la liberación de quimioterapia en pacientes con tumores cerebrales, pero este método provoca más efectos secundarios y la liberación no intencionada de antineoplásicos en el tejido cerebral sano (Loch-Neckel and Koepp, 2010). También se han utilizado moléculas vasoactivas, como el leucotrieno C₄, la bradicinina, la serotonina y la histamina, para aumentar la permeabilidad de los capilares en los tumores cerebrales. A diferencia de los agentes osmóticos, los análogos de bradicinina son selectivos en los tumores en humanos en comparación con el cerebro normal. Sin embargo, la apertura de la barrera no es un método específico para liberar medicamentos, ya que conduce a un aumento de las moléculas potencialmente tóxicas, como la albúmina, y hace que el cerebro sea vulnerable a las infecciones y las toxinas incluso durante períodos breves (Azad et al., 2015).

Desde una perspectiva clínica, el aumento de la permeabilidad de la BHE suele ser una consecuencia de una patología cerebral. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de la isquemia cerebral. Ésta es una enfermedad patofisiológica compleja que implica una pérdida de flujo sanguíneo, así como el agotamiento de oxígeno y nutrientes esenciales en el tejido cerebral. Como consecuencia, existe una mayor permeabilidad y alteración de las uniones estrechas de la BHE. Algunos experimentos en animales han demostrado que las proteínas del suero que se escapan en el cerebro pueden servir como un mecanismo de señalización directa que resulta en la activación de los astrocitos y el sistema inmune del cerebro, con la consiguiente hiperexcitabilidad neuronal y neurodegeneración (Abbott and Friedman, 2012).

Inyección directa en el cerebro

Una metodología alternativa es la introducción de fármacos directamente en el parénquima cerebral. El principal obstáculo de este método es el coeficiente de difusión limitada. La difusión de un fármaco en el cerebro depende de la concentración en su lugar de liberación, el peso molecular, la liposolubilidad, la polaridad y la afinidad en los tejidos. Así, para las moléculas grandes, como los anticuerpos monoclonales, la velocidad de difusión tras la inyección suele ser menor que la velocidad de eliminación local. Se han llevado a cabo investigaciones acerca de algunos implantes poliméricos para el uso en seres humanos y animales tras la resección quirúrgica de tumores cerebrales que liberan el medicamento de una forma controlada (Loch-Neckel and Koepp, 2010). Un tipo de administración por inyección directa es la administración intraventricular. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que su eficacia con fármacos es limitada. Además de la intervención quirúrgica necesaria, existen otros problemas: el coeficiente de difusión depende mucho del peso molecular del soluto, así como de la velocidad de eliminación en el LCR en los ventrículos (Loch-Neckel and Koepp, 2010). Como el LCR se renueva completamente

cada 5-6 horas, la inyección del medicamento equivaldría a la perfusión por vía intravenosa lenta. En la práctica, este método sólo sería eficaz para medicamentos en los que el lugar de acción está cerca de la superficie del parénquima o los ventrículos (Loch-Neckel and Koepp, 2010).

2.4.2. Métodos no invasivos

Modificación química de fármacos (profármacos)

La modificación más común busca la mejora de la lipoficidad, típicamente por la inserción de restos lipídicos o por conjugación a un transportador liposoluble. La amidación o esterificación de grupos amino, carboxilo e hidroxilo aumenta la solubilidad del lípido del fármaco y mejora la captación cerebral. En algunos casos, el fármaco lipidizado actúa como profármaco que se convertirá en la molécula funcional a través de escisión enzimática, idealmente en el sitio diana (en nuestro caso, en el cerebro). Además de su aplicación en fármacos de pequeño peso molecular, esta estrategia ha sido empleada con éxito para péptidos (Lalatsa and Barbu, 2016). Un ejemplo destacado es el profármaco L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), empleado para tratar la enfermedad del Parkinson (Tam et al., 2016).

Administración de fármacos por vía intranasal

Esta técnica no invasiva se basa en salvar el obstáculo de la BHE haciendo que pasen las sustancias por zonas donde ésta no existe, como en los nervios olfatorios. Estudios recientes han revelado el potencial de esta técnica para el posible tratamiento del trastorno del autismo, ya que la oxitocina intranasal mejora el funcionamiento social y emocional en los individuos que presentan autismo (Tam et al., 2016). Sin embargo, la principal limitación es el pequeño número de moléculas capaces de difundirse a través del epitelio olfatorio (Tam et al., 2016).

Uso de la nanomedicina

Recientemente, la nanomedicina ha dirigido su atención al tratamiento de enfermedades del SNC. Actualmente, la principal vía de administración de agentes terapéuticos es a través del torrente sanguíneo, que distribuye el fármaco a través de todo el organismo. Esto no es solo ineficaz para el SNC, dado que muy poca cantidad del fármaco elude la BHE, sino que también da lugar a efectos secundarios dañinos en tejidos en áreas que no han sido afectadas. Los avances en nanotecnología han permitido construir partículas funcionales que han optimizado la cinética de carga y liberación de fármacos. Nanotransportadores tales como liposomas y nanopartículas son capaces de cruzar la BHE y entregar mayores cantidades de agentes terapéuticos en un sitio específico, reduciendo así la toxicidad a los tejidos circundantes (Lalatsa and Barbu, 2016).

Entrega mediante nanotransportadores

El uso de nanopartículas, que incluye liposomas, nanopartículas solido-lipídicas, nanoesferas, nanopartículas poliméricas, magnéticas, dendrímeros o nanoemulsiones, ha recibido una considerable atención en los últimos tiempos. El transporte de fármacos a través de la BHE mediante estas nanopartículas puede ser logrado con cualquiera de ellos, ya sea de manera pasiva o activa mediante mecanismos endocíticos que incluyen procesos mediante receptor o portador (Lalatsa and Barbu, 2016).

Idealmente, las nanopartículas necesitan ser inocuas, biodegradables y biocompatibles, con un diámetro de partícula preferiblemente entre 50 y 100 nm. También tienen que ser estables en sangre y evitar la opsonización, que es el proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito, para asegurar una vida media en circulación larga. El fácil acoplamiento de las nanopartículas con ligandos para la endocitosis mediante receptor o portador es preferible ya que esto permite la captación a través de la BHE, así como dirigirse a receptores específicos dentro del parénquima cerebral o tumor cerebral. Son también metas a alcanzar la posibilidad de adaptar el perfil de liberación de la carga, la escalabilidad y la fabricación rentable (Lalatsa and Barbu, 2016).

Múltiples mecanismos han sido propuestos para hacer que los fármacos, libres o junto con nanopartículas, crucen la BHE. Entre ellos, encontramos los siguientes procedimientos: (Lalatsa and Barbu, 2016): i) Alcanzar una mayor retención de las nanopartículas en los capilares sanguíneos del cerebro adheridos a las paredes capilares, lo que generará un gradiente de concentración para conseguir su transporte a través de la capa de células endoteliales; ii) un efecto tóxico sobre la microvasculatura cerebral que aumente la permeabilización de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del cerebro; iii) un efecto surfactante para la solubilización de los lípidos de la membrana celular endotelial que conduzca a la fluidización de la membrana y una mayor permeabilidad de la BHE; iv) la apertura de las uniones estrechas entre las células endoteliales permite el paso a través de la BHE; v) endocitosis por las células endoteliales y posterior liberación al cerebro; vi) transcitosis a través de las células endoteliales; vii) combinaciones de los mecanismos anteriores (Lalatsa and Barbu, 2016).

A continuación se presentan los distintos tipos de nanotransportadores existentes:

Liposomas.

Los liposomas son pequeñas vesículas compuestas de una o más bicapas de fosfolípidos que encierran un espacio acuoso. Su tamaño, carga superficial, composición lipídica y contenido de colesterol pueden manipularse para controlar la administración del fármaco y la absorción del tejido. Es el tipo de nanotransportador más utilizado y reconocido clínicamente (Lalatsa and Barbu, 2016).

Las formaciones liposómicas más comunes a la hora de establecer la ruta hacia la BHE son catiónicas, PEGiladas (unión de una molécula de polietilenglicol) o marcadas con anticuerpo. Aunque el mecanismo no es totalmente comprendido, se piensa que los liposomas catiónicos se adhieren al endotelio cerebral negativamente cargado y debido a su pequeño tamaño pueden ser transportados vía difusión pasiva o por fagocitosis (Lalatsa and Barbu, 2016).

El polietilenglicol (PEG) injertado en la superficie de los liposomas les permite evadir el sistema retículoendotelial (RES), prolongando consecuentemente su tiempo de circulación sanguínea y dándoles tiempo para introducirse por la BHE. Sin PEG, los liposomas tienden, bien a ser engullidos por fagocitos, o bien a intercambiar materiales lipídicos con membranas celulares (Lalatsa and Barbu, 2016).

Al igual que con muchas otras formulaciones de nanopartículas, los liposomas pueden hacerse más complejos al añadir un anticuerpo o ligando, que será reconocido por un receptor de la BHE, induciendo una endocitosis mediada por receptor (Lalatsa and Barbu, 2016).

Nanopartículas poliméricas.

Los materiales biodegradables son de origen natural o sintético y se degradan *in vivo*, ya sea enzimáticamente o no, o ambos, para producir subproductos biocompatibles, toxicológicamente seguros, que son eliminados por las vías metabólicas normales. El número de estos materiales usados en aplicaciones de administración de fármacos ha aumentado exponencialmente durante la última década (Makadia and Siegel, 2011). La biocompatibilidad es la otra característica fundamental a tener en cuenta en materiales con usos en aplicaciones biomédicas. Ésta está referida a la capacidad de un material para producir una respuesta adecuada en un organismo hospedador en una determinada situación.

Los polímeros más comunes para aplicaciones de liberación controlada de fármacos en la actualidad son el ácido poliláctico (PLA) y el ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) (Tam et al., 2016). Será este el tipo de nanopartículas que se desarrollarán en el presente trabajo de fin de grado.

Es por ello que se ha comprobado la mayor o menor eficiencia de algunos materiales poliméricos en aplicaciones de administración de fármacos (Tabla 2.2). El PLA es uno de los principales candidatos poliméricos para usar en este tipo de aplicaciones. Esto se debe, principalmente, a que se trata de un polímero biodegradable y biocompatible (Xu et al., 2006) ampliamente conocido. Otras características de gran importancia que posee son su gran resistencia mecánica y buenas propiedades de conformado y moldeado.

Tabla 2.2: Resumen de nanopartículas y materiales utilizados en administración de medicamentos antipsicóticos (Sun et al., 2016).

Drug Name	Nanoparticle Type	Materials
Haloperidol	Solid lipid	Glyceryl Monostearate + Tween 80
	Polymer	Poly- ϵ -caprolactone + Polysorbate 80
	Dendrimer	Polyamidoamine
Chlorpromazine	Supramolecule	Calixarene
Perphenazine	Polymer	PLGA
	Polymer	PLGA
Promazine	Polymer	PLGA
Risperidone	Solid lipid	Compritol® 888ATO
	Solid lipid/Polymeric Hydrogel	Glyceryl Monostearate + Carbomer 2001
	Solid lipid/Polymeric Implant	Stearic acid/Glyceryl Monostearate + PLGA
Paliperidone	Solid lipid	Capmul® GMS-50K + sodium deoxycholate
	Solid lipid	Capmul® GMS-50K + Gelucire® 50/13
	Solid lipid	Stearic acid + Gelucire® 50/13
Quetiapine	Solid lipid	Glyceryl Trimyristate + Poloxamer 188 & 407
	Polymer	Chitosan + Tripolyphosphate
	Solid lipid/Polymeric Hydrogel	Glycerol monostearate + Poloxamer 188 & 407
Clozapine	Polymer	Poly-L-glutamic acid + Poly-L-lysine
	Polymer	Poly- ϵ -caprolactone + Polysorbate 80/PEG/CS
Olanzapine	Polymer	PLGA
	Polymer	Chitosan + Tripolyphosphate
Aripiprazole	Polymer	Poly(caprolactone) + Poloxamer 188 & 407
Sulpiride	Solid lipid	Dynasan/Stearic acid + Tween 80

El PLGA es un copolímero sintetizado a partir del PLA. Este copolímero se trata del biomaterial disponible para administración de fármacos que mejores resultados ha ofrecido en cuanto a diseño y rendimiento. Sus principales características son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades de liberación controlada (Kapoor et al., 2015)

Otro material utilizado con frecuencia en el campo de la administración de agentes farmacológicos es la policaprolactona (PCL), ya que se trata de un polímero de una degradación más lenta que, entre otros muchos, el PLA. Además, su uso está autorizado por la FDA en EEUU. Se han descrito algunos fármacos que han sido encapsulados en micropartículas o nanopartículas de este material (Bock et al., 2011). Comparándolo con el PLGA, presenta la gran ventaja de que genera un ambiente menos ácido durante su degradación (Bock et al., 2011).

Debido a que el PLGA no estaba disponible en YFlow Sistemas y Desarrollos S.L, se trabajó con PLA y PCL.

Nanopartículas sólido-lipídicas.

Están compuestas por un núcleo sólido hidrófobo de lípidos, tales como mono-, di- y triglicéridos o ácidos grasos junto con una monocapa de revestimiento de fosfolípidos. Al igual que las nanopartículas poliméricas son capaces de realizar la liberación contralada en un tiempo de hasta varias semanas, también pueden recubrirse con ligandos para la fijación de fármacos. Así mismo, también son estables y biodegradables en condiciones fisiológicas con una alta capacidad de carga de fármacos, tanto hidrófilos como lipófilicos. Por

lo tanto, es una interesante alternativa al uso de liposomas o nanopartículas poliméricas. Fueron diseñadas para hacer llegar fármacos quimioterapéuticos al cerebro (de Boer and Gaillard, 2006).

Nanopartículas magnéticas.

Recientemente, las nanopartículas magnéticas (MP) han sido objeto de estudio debido a su potencial en terapia y estudios de imagen, con especial atención a las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, también llamadas SPIONS. Su aplicación como agente de contraste de resonancia magnética (MRI) ha sido ampliamente documentada, y a diferencia de sus homólogos basados en gadolinio, las SPIONS pueden ser procesadas por la ruta metabólica del hierro de una célula (Tam et al., 2016).

Con varias modificaciones en su superficie y capacidad de sigilo, las SPIONS pueden ser dirigidas a zonas específicas y ayudar a delinear tumores malignos del tejido sano (Tam et al., 2016).

2.5. Electrospraying & Electrospinning coaxial

2.5.1. Fundamento: Microencapsulación

La microencapsulación de principios activos puede definirse desde el punto de vista tecnológico como un proceso de recubrimiento por el que se obtienen sistemas multiparticulares, que en función de su morfología y estructura interna pueden denominarse micropartículas, microesferas o microcápsulas, teniendo todos ellos en común el tamaño de partícula, el que siempre es inferior a $1000\ \mu\text{m}$. El trabajo que se realiza en este TFG es el desarrollo del proceso de microencapsulación para la liberación controlada de fármacos.

2.5.2. Antecedentes

Durante las dos últimas décadas se han estudiado diferentes técnicas de microencapsulación. Uno de los métodos más usados ha sido el empleo de una doble emulsión (agua-aceite-agua). Otras técnicas incluyen la atomización por ultrasonidos para encapsular moléculas solubles en agua (por ejemplo, fármacos, enzimas, factores de crecimiento y ADN) para inmovilizarlas o liberarlas de manera controlada (Xu et al., 2006).

Las técnicas electrodinámicas (EHD) se basan en procedimientos que utilizan fuerzas electrostáticas como fuerza motriz para fabricar fibras o partículas de diferentes formas con tamaños en el rango de nanómetros a micrómetros a través de un chorro, que es un fluido cargado eléctricamente (Enayati et al., 2011).

Electrospinning y electrospraying son dos tipos de técnicas EHD utilizadas para la fabricación continua de fibras ultrafinas y partículas, respectivamente.

Esta tecnología, cuya licencia es propiedad de YFlow Sistemas y Desarrollos S.L, consiste en la generación y control, por medios electro-hidrodinámicos, de chorros compuestos de dos o más líquidos inmiscibles, que fluyen coaxialmente o de modo que uno de ellos englobe o cubra al resto, y cuyos diámetros pueden variar entre unas decenas de micras y unos pocos nanómetros. La rotura de estos chorros, por inestabilidades varicosas, da lugar a un spray de gotas estructuradas donde uno de los líquidos contiene al resto. Las gotas compuestas resultantes presentan tamaños aproximadamente iguales dentro del rango micro y nanométrico.

Estas propiedades, unidas al hecho de que este procedimiento permite un control excelente sobre la estructura de la cápsula (espesor de la corteza a diámetro de la misma), hacen de esta tecnología una rama muy competitiva frente a otras formas de encapsulado que no reúnen simultáneamente la capacidad de controlar el tamaño y la estructura de las cápsulas, así como la dispersión de sus tamaños. Además de nanocápsulas y nanoesferas huecas, este procedimiento permite sintetizar también nanotubos y nanofibras coaxiales si se retarda apropiadamente el tiempo de rotura del chorro frente al de solidificación del líquido que fluye por el exterior (nanotubos) o el de ambos (nanofibras coaxiales). Las nanopartículas producidas mediante esta tecnología ya tienen aplicación en los siguientes campos: Microencapsulación, Textil, Tecnología Alimentaria, Farmacia, Bioingeniería, Ciencias de los Materiales, Catálisis, Nanosensores y Telecomunicaciones (Zamani et al., 2013).

A continuación, se describe con detalle cada una de las distintas modalidades que se dan en esta técnica, y las mejoras que conlleva llevar a cabo estos procesos de manera coaxial.

2.5.3. Electrospinning

El Electrospinning es la técnica más popular y preferida para la fabricación de nanofibras, debido a su simplicidad, rentabilidad, flexibilidad, capacidad para hilar un amplio rango de polímeros. Se aplica un potencial eléctrico fuerte al líquido polímero (en solución) y como resultado las cargas eléctricas se acumulan en la superficie de la gota del líquido en la punta del capilar (Zamani et al., 2013).

A un voltaje crítico, la repulsión de Coulomb de las cargas supera la tensión superficial de la gota del polímero, y un chorro cargado es eyectado de la punta de la gota. Es en ese momento cuando se forma el cono de Taylor (Zamani et al., 2013). El chorro viaja hacia un electrodo conectado a tierra, mientras que el disolvente se evapora, y las fibras resultantes se recogen sobre la base de un tubo colector conectada a tierra. Debido a las notables características de las nanofibras, tales como la elevada relación superficie/volumen, alta porosidad, posibilidades para una funcionalización superficial eficiente,

morfología superficial ajustable, y semejanza estructural a la matriz extracelular son utilizadas con mucha frecuencia en la regeneración de tejidos y aplicaciones de administración de fármacos (Zamani et al., 2013).

El Electrospinning proporciona la oportunidad para la encapsulación directa de fármacos en fibras electrohiladas. Tanto los fármacos hidrófobos (por ejemplo, rifampina, paclitaxel) como los hidrófilos (clorhidrato de tetraciclina, hidrocloreuro de doxorubicina) y biomacromoléculas, tales como proteínas y ADN, pueden encapsularse en las fibras electrohiladas. Además, la administración local de fármacos utilizando fibras electrohiladas puede disminuir la dosificación mínima requerida del fármaco, conduciendo a una menor absorción sistémica y reduciendo los efectos secundarios no deseados.

Electrospinning coaxial

Este proceso es una versión modificada del proceso de Electrospinning simple, que permite la producción de fibras con una morfología *core-shell*. La incorporación de biomoléculas tales como ADN, por mezcla con soluciones de polímeros, causó que las moléculas de ADN se alojaran en la superficie de las fibras, en lugar de ser encapsulado dentro de las fibras (Zamani et al., 2013).

Para mejorar la funcionalidad de las biomoléculas se realizó un electrospinning coaxial, donde la solución de biomolécula formó el chorro interior y fue coelectrohilada con una solución de polímero que formó el chorro exterior. El polímero de la cáscara (*Shell*) no sólo contribuye a la liberación sostenida y prolongada del agente terapéutico, sino que también desempeña un papel esencial en la protección del núcleo de la exposición directa al ambiente biológico.

La principal ventaja que aporta este método sobre el método de Electrospinning simple es que las fibras se fabrican a partir de dos soluciones bien diferenciadas, minimizando así la interacción entre las moléculas biológicas acuosas y los disolventes orgánicos en los que el polímero es disuelto. Como resultado, no sólo se puede conservar la bioactividad de las moléculas biológicas inestables, sino que también se pueden evitar procesos de modificación como la liofilización de ADN plasmídico (pDNA) (Zamani et al., 2013).

2.5.4. Electrospraying

El Electrospraying, una versión modificada del proceso de Electrospinning, es una técnica prometedora para la preparación de micro y nanopartículas adecuadas para los sistemas de administración de fármacos (Zamani et al., 2013). Las micro y nanopartículas poliméricas son capaces de ser administradas por vía oral, por inyección o inhalables. Este método supone una gran mejora respecto a otros métodos de fabricación de micro y nanopartículas poliméricas biodegradables. Un punto a tener en cuenta es la facilidad para incorporar fármacos hidrofílicos. Al mismo tiempo, la inactivación o degradación del fármaco es posi-

ble, debido a la exposición al disolvente organico, alta tensión de corte, alta temperatura e interfases organicas acuosas, especialmente para las biomacromoléculas (Zamani et al., 2013).

De manera similar al proceso de Electrospinning, la fabricación de partículas poliméricas cargadas con fármaco a través del Electrospraying se puede realizar usando una solución de polímero y fármaco en un disolvente suficientemente conductor. El principio de Electrospraying es similar al proceso de Electrospinning, y al alterar las propiedades de la solución, por ejemplo, la concentración, así como parámetros de procesamiento tales como caudal y tensión aplicada, un chorro continuo y cargado puede descomponerse en gotitas, dando lugar a partículas de diferente tamaño y forma (Zamani et al., 2013).

Las principales ventajas del uso del electrospraying respecto a otros métodos convencionales de encapsulación es la capacidad de obtener una mayor eficiencia de carga, distribución estrecha de tamaño de partícula y facilidad de síntesis de partículas debido al procesamiento en único paso. Además, este método elimina la necesidad de usar un elemento tensioactivo como surfactante (Zamani et al., 2013), a no ser que la tensión superficial del líquido a utilizar sea de gran valor.

Electrospraying coaxial

Mediante esta configuración, se fabricaron partículas, arquitectura core-shell monodispersas con fármacos incrustados en el núcleo. La encapsulación, sin perder su funcionalidad, de moléculas bioactivas inestables, tales como proteínas, enzimas y antibióticos, fue posible gracias a este método (Zamani et al., 2013). Se debe tener en cuenta en todo momento que el tamaño y la estructura interna de las partículas con arquitectura core-shell tienen que ser controlados de manera precisa, ya que la liberación del fármaco está principalmente controlada por la difusión del mismo por la envoltura polimérica. Se demostró el Electrospraying es un método capaz de producir partículas monodispersas cargadas con fármaco con alta eficiencia de encapsulación (Zamani et al., 2013).

La principal diferencia entre el proceso de Electrospinning y Electrospraying radica en la densidad de la cadena del polímero de la disolución. Estudios han demostrado que existe una concentración crítica de polímero C_{ov} que puede determinar el paso de Electrospraying a Electrospinning. Esta concentración crítica varía según el polímero. Para producir fibras, es decir, para que se dé un proceso de Electrospinning, se debe elegir una concentración de polímero, C , que supere el umbral C/C_{ov} (Bock et al., 2011).

Dado que uno de los objetivos de este trabajo es, en primera instancia, la formación de partículas, se procuró en todo momento llevar a cabo un proceso de Electrospraying, o Electrospraying coaxial para la posterior obtención de las cápsulas. No obstante, como se detalla más adelante en este trabajo, hubo veces en las que tras aumentar la concentración de polímero de las disoluciones, se daba lugar a procesos de Electrospinning.

2.5.5. Fundamento teórico Electrospraying/Electrospraying coaxial

El Electrospraying es un proceso de formación simultánea de gotas y cargadas por cientos de campos eléctricos. En este proceso, un líquido fluye a través de un capilar mantenido a un alto potencial, está sujeto a un campo eléctrico, que causa la elongación del menisco en forma de chorro. El chorro se deforma en gotas, debido principalmente a la fuerza eléctrica que se ejerce (Jaworek, 2007).

Como se ha comentado en la sección 2.5.4, el Electrospraying es un proceso que permite la formación de partículas. Cuando una gota cargada se evapora, el polvo aglomerado en ella cae suspendido sobre la base de un tubo colector. Para una gota producida a partir de una solución, la sustancia restante cristaliza formando una partícula sólida. El tamaño de dichas partículas puede controlarse variando el valor de las distintas variables que afectan en el proceso (Jaworek, 2007). En la Figura 2.3 se puede ver el montaje típico de un sistema de Electrospraying.

Una de las características más importantes de un sistema de Electrospraying es el modo de pulverización. Los modos de pulverización difieren en el proceso de formación del menisco y del chorro que emerge de este menisco (Chen and Pui, 1997). Los modos de pulverización dependen de las propiedades del líquido, tales como conductividad, tensión superficial, viscosidad, voltaje, y caudal. Es por ello, que surge la necesidad de poder predecir de algún modo el modo requerido de pulverización y el tamaño de las gotas producidas en dichos modos. Existen unas leyes de escala que caracterizan el proceso de Electrospraying, sin embargo son sólo aplicables al modo de pulverización de chorro cónico (Chen and Pui, 1997).



Figura 2.3: Kit básico de electrospraying .

Las leyes de escala son necesarias para caracterizar un sistema de electrospray definido. Permiten conocer el tamaño de la gota producida y la corriente emitida, y su relación con todos los factores involucrados, y permiten un mejor entendimiento de todo el proceso. Dos leyes de escala han sido principalmente descritas a lo largo de los últimos años. Las leyes de escala que se facilitan a continuación están basadas en el análisis dimensional de todos los parámetros involucrados en el proceso (De La Mora and Loscertales, 1994), tales como conductividad eléctrica (K), tensión superficial (γ), viscosidad (μ), permitividad del vacío (ϵ_0), de valor conocido $8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m, densidad del líquido (ρ), constante dieléctrica (κ) y caudal (Q).

De estudios previos realizados, se pueden extraer principalmente dos conclusiones (Chen and Pui, 1997): (1) el tamaño de gota producido es linealmente proporcional a r^* en una solución concreta, que se define como $(Q\tau)^{1/3}$ (donde τ es el tiempo de relajación de la carga y es definido como $(\kappa\epsilon_0/K)$, por lo que sustituyendo el valor de τ resulta que:

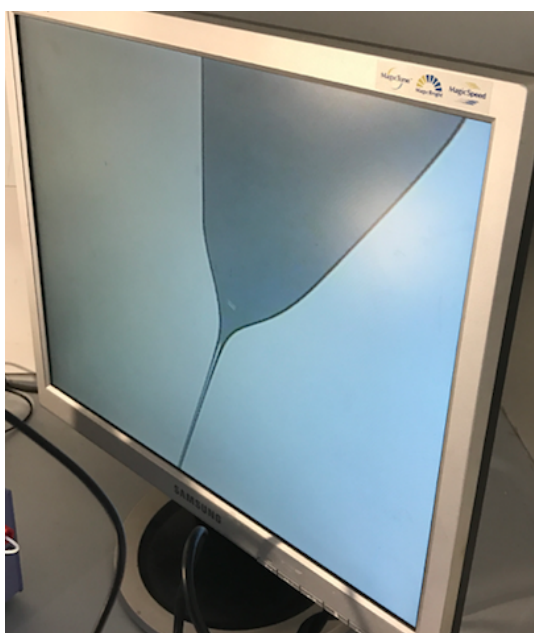
$$r^* = \left(\frac{Q\kappa\epsilon_0}{K} \right)^{1/3} \quad (2.5.1)$$

y, (2) la corriente i emitida puede ser escalada como $(\gamma K Q / \kappa)^{1/2}$ para cada solución. Tras los estudios y experimentos realizados, se llegó a estimar el valor del caudal mínimo para una determinada solución en un sistema de electrospraying concreto, que fue escalado como:

$$Q_{min} = \frac{\gamma\kappa\epsilon_0}{\rho K} \quad (2.5.2)$$

En la figura 2.4 se puede observar dos configuraciones estables distintas de cono de Taylor. A parte de estos parámetros estudiados, también existen otras variables en el proceso que pueden hacer variar el tamaño y morfología de las partículas solidificadas. A continuación pasan a describirse:

- **Voltaje aplicado.** Se trata probablemente del parámetro más importante para determinar el tamaño de la partícula. La cantidad de voltaje a usar será inversamente proporcional al valor de conductividad eléctrica de la disolución utilizada. Los cambios en el voltaje aplicado llevan a cambios en el modo chorro. Existe un valor de voltaje, llamado voltaje crítico, a partir del cual no se da la formación de cono. (Park and Lee, 2009)
- **Distancia TTC.** *Tip to collector distance.* Se trata de la distancia existente desde la punta de la aguja hasta el tubo colector. Esta distancia determina el tiempo de evaporación del disolvente cuando una gota está *volando* hacia la base del tubo colector. Incrementar esta distancia hace disminuir el potencial eléctrico aplicado pero incrementa el tiempo de vuelo. Si el tiempo de vuelo es insuficiente, las partículas llegarán a la base del colector mojadas porque el tiempo necesario para que el disolvente contenido en las partículas se evapore no se tiene. (Park and Lee, 2009)



(a) Estructura cono de Taylor con disolución de PCL (b) Estructura cono de Taylor con disolución de PLA

Figura 2.4: Fotografías de conos de Taylor durante experimento de Electrospraying

Capítulo 3

Trabajo de laboratorio

En este capítulo se recoge detalladamente el trabajo que se desarrolló en el laboratorio de YFlow Sistemas y Desarrollos S.L y posteriormente en el laboratorio dirigido por Ignacio Loscertales en la Escuela de Ingenierías industriales de la UMA. El diseño y desarrollo de cápsulas poliméricas haciendo uso de la técnica de Electrospraying & Electrospinning coaxial se completó en las siguientes fases:

1. **Familiración con el instrumental de laboratorio.** En esta fase, el trabajo se centró en adquirir el manejo básico del instrumental de laboratorio, y conocer los protocolos básicos de seguridad para trabajar en él.
2. **Desarrollo de partículas.** Se lleva a cabo el desarrollo de las partículas poliméricas a través del uso de la técnica de Electrospraying & Electrospinning simple, según la revisión de materiales previamente realizada.
3. **Caracterización de partículas.** Tras la fase de obtención de las partículas, se necesita caracterizarlas para poder así seleccionar las que aporten mejores rendimientos, en cuanto a su morfología y tamaño.
4. **Desarrollo de cápsulas.** Tras seleccionar las partículas que arrojaron mejores resultados, se pasó a encapsular el LCR con ellas, mediante Electrospraying & Electrospinning coaxial

3.1. Metodología

3.1.1. Materiales

A continuación, se detallan todos los materiales empleados para llevar a cabo los experimentos.

Los polímeros empleados han sido:

- PLA (peso molecular de 175000 Da), en forma de gránulos esféricos de 2-4 mm (Sigma Aldrich).

- PCL (peso molecular de 80000 Da), en forma de gránulos esféricos de 2-4 mm (*Sigma Aldrich*).

Los disolventes empleados fueron Diclorometano (DCM), Acetona, Cloroformo, N-N-dimetilformamida(DMF), N,N-dimetilacetamida (DMAc). También fueron utilizados como aditivos para modificar propiedades de las disoluciones, tales como viscosidad o tensión superficial glucosa y *SPAN80*, respectivamente. Todos estos disolventes y materiales fueron suministrados por *Sigma Aldrich*.

3.1.2. Preparación de disoluciones

Las disoluciones se prepararon en recipientes de plástico, o de vidrio en el caso de las disoluciones en las que se empleó cloroformo. Empleando una balanza se pesó la cantidad adecuada de polímero para cada concentración a conseguir en los recipientes, vertiéndose a continuación el volumen adecuado de disolvente. La disolución polimérica resultante se agitó con un agitador magnético (0 a 5000 rpm). Para facilitar la agitación el uso de imanes fue necesario. El tiempo de agitación dependía de las propiedades del polímero. Por ejemplo, la PCL requería un menor tiempo de agitación que el PLA, normalmente los tiempos de agitación tomados variaban entre 3 y 24 horas. En el caso de la disolución de PCL con cloroformo, el uso de calor fue necesario.

Por cuestiones de disponibilidad y costes de aislamiento del neuropéptido, se decidió encapsular líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). De esta manera, se está asegurando encapsular el neuropéptido GAL, ya que éste va disuelto en el LCR.

La disolución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa), preparada en el departamento de Fisiología Humana de la facultad de Medicina de la UMA. Consta de los componentes y proporciones mostradas en la tabla 3.1. El LCRa obtenido es el resultado de tomar 1 ml de cada una de las disoluciones madre, y se vierten en un recipiente. Tras obtener la disolución, el pH fue medido resultando un valor de 7,4. Posteriormente, se dejó enfriar a una temperatura de 4°C.

Para llevar a cabo el experimento de electrospraying coaxial, el colorante de azul de metileno fue añadido al LCRa con el fin de ver de manera más clara la estructura que forma el líquido interior, y que así se diferencien ambas disoluciones, la que circula por dentro (*core*) de la que va por fuera (*shell*). Adicionalmente, también está pensado para usarlo como marcador a la hora de la liberación controlada del farmaco encapsulado.

Tabla 3.1: Composición LCRA

Disoluciones madre	en 50 ml de H_2O desionizada	Peso molecular
$ClNa_2$	2,88 g	81,43 g/mol
$NaCO_3H$	0,788 g	84,01 g/mol
KCl	0,0725 g	74,56 g/mol
KH_2PO_4	0,1099 g	136,09 g/mol
$CaCl_2$	0,0648 g	147,02 g/mol
$MgCl_2$	0,0676 g	203,3 g/mol
Na_2SO_4	0,0284 g	142,04 g/mol
Glucosa	0,424 g	180,16 g/mol

3.1.3. Maquinaria empleada

Los componentes necesarios para llevar a cabo un experimento de electrospraying & electrospinning coaxial son los siguientes (Figura 3.1):

- **Inyector.** Se trata de un artilugio con geometría cilíndrica, y que está sellado. Su principal función es bombear los fluidos desde la bomba hacia el exterior de la punta de la aguja, Se han usado de dos tipos: inyector simple para el proceso de electrospraying simple y inyector coaxial para el proceso de electrospraying coaxial. Este último consiste en una pareja de capilares donde uno más pequeño se inserta concéntricamente dentro de uno más grande. Se destaca que en la configuración coaxial, el uso de un muelle entre los tubos, interior y exterior, fue necesario. Para la realización del experimento de electrospraying simple el capilar utilizado tenía diámetro de 0,7 mm. En el montaje coaxial, los capilares usados tenían diámetros exterior e interior, respectivamente, de 1,4 mm y 1,1 mm en el caso del capilar de fuera y, 0,7 mm y 0,4 mm en el caso del capilar que queda por dentro.
- **Jeringuilla.** Es el recipiente en el que van depositadas las disoluciones previo a la realización del experimento de electrospraying. Fueron utilizadas jeringuillas *BD plastic* de 3 y 5 mm. Es importante seleccionar bien este dispositivo pues cuanto más pequeña sea, será posible obtener un rango real de caudales más pequeños.
- **Bomba de infusión.** Equipo utilizado *Harvard Apparatus pump 11 élite*. El rango de caudales es el siguiente: Caudal mínimo aplicable para una jeringuilla de 0,5 μ l, de 1,28 pL/min y caudal máximo aplicable para una jeringuilla de 60 ml, de 88,28 ml. Este caudal aplicado (Q) impulsa la solución encerrada en la jeringuilla hacia el exterior.
- **Tubo colector.** Superficie sobre la que se depositan las partículas. Se suele poner un papel de aluminio sobre él para que la recogida de partículas sea más fácil y

segura.

- **Fuente de alta tensión.** Fuente cuyo terminal positivo está en contacto con el inyector y el terminal negativo, la tierra, con el tubo colector.

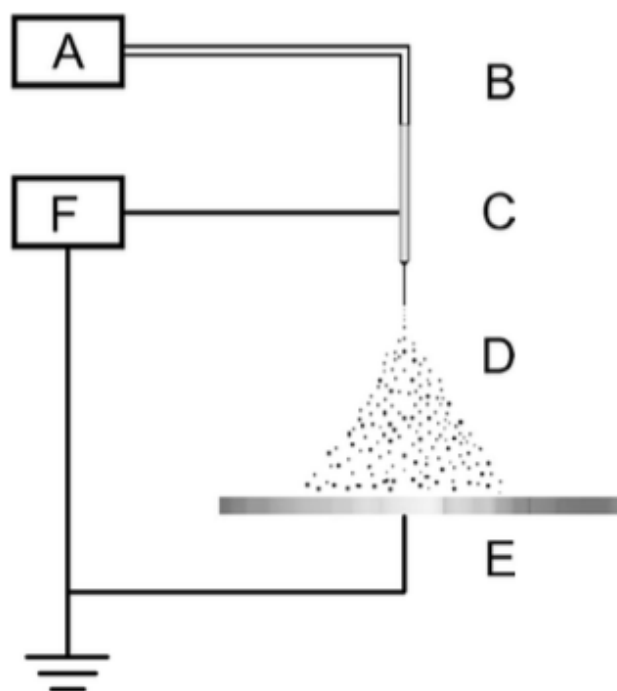


Figura 3.1: Representación esquemática de los componentes del proceso de electrospinning. A bomba; B línea de alimentación; C inyector y aguja; D electrospay; E tubo colector; F fuente de alimentación de alto voltaje (Xu et al., 2006).

3.1.4. Detección de circularidad

La forma ideal de las partículas es esférica. Con el fin de determinar la frecuencia de aparición de partículas esféricas, a partir de un determinado diámetro dentro de una imagen, se implementó un algoritmo en MATLAB basado en la transformada de Hough. El código implementado se puede ver en el anexo que acompaña a este trabajo.

3.1.5. Cálculo de la conductividad

Con el objetivo de concluir si se podía realizar experimento de electrospinning con el LCRA, se midió la conductividad eléctrica de dicho líquido. En el anexo que acompaña a esta memoria se detalla el código de MATLAB utilizado para calcular la conductividad de un líquido, a partir de un experimento previamente realizado. El fundamento del experimento (Figura 3.2) consiste en alimentar un circuito, formado por una resistencia, que es el líquido del que se quiere medir la conductividad, conectada en serie con otra resistencia

de valor conocido $R_p = 1 \times 10^6 \Omega$, que es la resistencia del voltímetro. Haciendo un simple

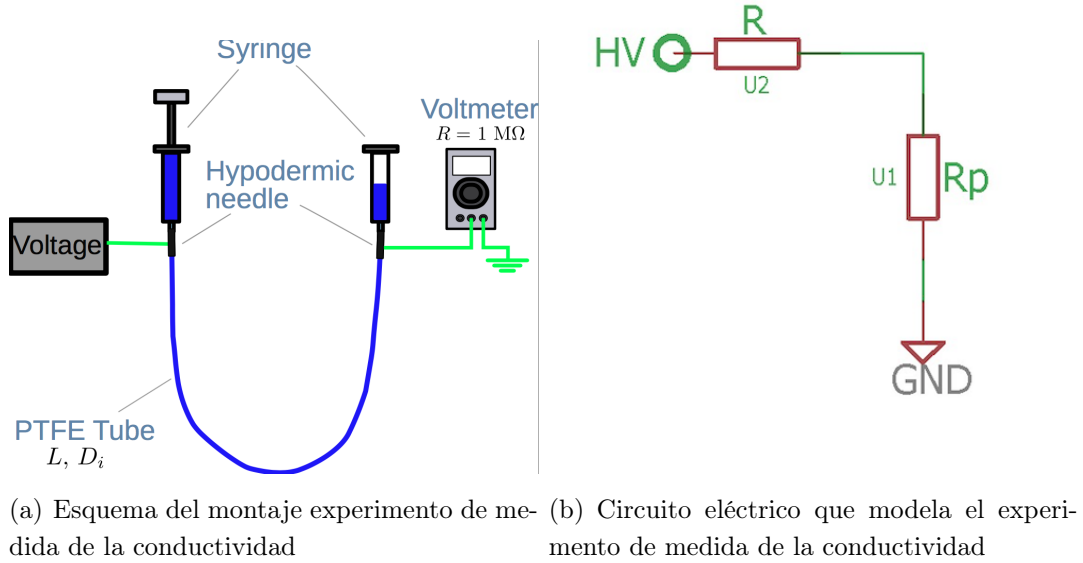


Figura 3.2: Experimento de medida de la conductividad

análisis del circuito mostrado en la figura 3.2, se obtiene que:

$$HV = U_1 + U_2 \quad (3.1.1)$$

Siendo HV la fuente de tensión conectada al circuito y U_1 y U_2 los valores de las caídas de tensiones en R y R_p , respectivamente. Es, por tanto que aplicando la ley de Ohm se puede obtener de manera trivial el valor de la intensidad i que circula por la resistencia R_p .

$$i = \frac{U_1}{R_p} \quad (3.1.2)$$

Además, conociendo la resistencia en un tubo conductor de longitud L y Área A, se tiene que:

$$R = \frac{U_2}{i} = \frac{HV - U_1}{i} = \frac{1}{K} \frac{L}{A} \quad (3.1.3)$$

De donde es trivial obtener la forma de la conductividad (K), sabiendo que el área de la sección transversal A de un tubo se define como $\pi D_i^2/4$, siendo D_i el diámetro del tubo.

$$K = \frac{4Li}{(HV - U_1) \pi D_i^2} \quad (3.1.4)$$

Finalmente, interpolando con los valores del potencial aplicado (HV) y la intensidad (i) se puede calcular la expresión de la conductividad (Ecuación 3.1.4)

3.1.6. Observación de muestras a microscopía

El tamaño y morfología de las partículas obtenidas fue medida usando el microscopio electrónico de barrido (SEM) JSM-6490LV de la UMA, ubicado en las instalaciones de

los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI). Se trata de un microscopio de barrido con sistema de microanálisis EDX y bajo vacío. Voltaje de aceleración desde 0,3 hasta 30 kV, con una resolución de hasta 3nm. Antes de observar las muestras en el SEM, éstas fueron depositadas en trozos de cinta adhesiva de doble cara y luego fueron revestidos al vacío con platino para hacer la muestra conductora. Para la posterior caracterización de las mismas, el software ImageJ fue utilizado.

Para la observación de las muestras al microscopio óptico fue utilizado un equipo Motic BA400. Un procedimiento de calibración fue llevado a cabo previo a la utilización del equipo. Para una mejor visualización de las muestras, el dispositivo fue conectado a un monitor y a una cámara, y mediante el uso del software AVerMediaTV se permitía ver las muestras observadas al óptico en la pantalla.

El diámetro de las partículas fue calculado tras la selección aleatoria de una población de 40 partículas, siendo la media el parámetro de distribución escogido. Como medida de error, la desviación típica fue utilizada.

3.2. Generación de partículas

3.2.1. Experimentación

A continuación se describen para cada uno de los experimentos realizados los materiales usados, su concentración, las condiciones de desarrollo y los problemas surgidos. La tabla 3.2 muestra un resumen de las condiciones en las que se llevó a cabo cada experimento. La temperatura y la humedad relativa del ambiente oscilaron entre 20 y 24 ° C y entre 43 y 49 %, respectivamente.

Experimento 1

Se prepararon 15 ml de una disolución de 3 % de PLA en DCM. El DCM es un disolvente muy volátil, con una temperatura de ebullición de 39,6°C . Debido a esto, al iniciar el experimento se evaporó rápidamente, por lo que la concentración de polímero aumentó y se solidificaba nada más salir por la punta de la aguja del inyector. La estructura de cono de Taylor no se alcanzó con ningún rango de caudales ni tensiones (se probó con valores comprendidos entre 0,5 y 1,5 ml/h), por lo que no se pudo recoger ninguna muestra al no depositarse nada en la base del colector.

Experimento 2

Para solucionar el problema encontrado en el experimento 1, se probó a cambiar a otro disolvente menos volátil como es el DMAc. Se preparó una disolución de 5 % de PLA en DMAc. Se consiguió obtener la estructura de cono de Taylor con un valor de caudal de 0,5 ml/h y una distancia TTC de 20 cm. El valor de tensión aplicada fue de 13 kV. Con esta configuración se obtuvo una muestra, aunque las partículas depositadas no llegaban a la

base del colector totalmente secas pues al pasar una varilla por la huella no se arrastraba la muestra.

Experimento 3

Para tratar de solucionar el problema del mojado de las muestras, se podría incrementar la distancia TTC o disminuir el valor del caudal aplicado. Se decidió probar en primer lugar la reducción del valor del caudal respecto al experimento anterior hasta un valor de 0,2 ml/h, y la tensión fijada a 13kV, pero no se obtuvieron resultados positivos.

Experimento 3.1

Posteriormente, se decidió volver a incrementar el caudal 0,5 ml/h y a incrementar la distancia TTC hasta 25,5 cm, puesto que al aumentarla el tiempo de caída de la partícula será mayor y por tanto hay más tiempo para que se evapore el disolvente. Con estos parámetros, se volvieron a obtener resultados negativos, puesto que las partículas depositadas en la base del colector seguían llegando mojadas.

Experimento 4

Por la persistencia del problema, se consideró bajar el punto de ebullición al DMAc adicionando acetona, que tiene una temperatura de ebullición de 56°C. Por tanto, el disolvente queda como una mezcla de DMAc/Acetona en una proporción 7,5:2,5. Adicionalmente, se aumentó la concentración de polímero PLA hasta un 7 %. Usando un caudal de 0.9 ml/h, una distancia TTC de 22 cm y una tensión de 15 kV se obtuvieron fibras pero no partículas, por lo que ocurría un proceso de electrospinning.

Experimento 5

Para tratar de obtener partículas en vez de fibras, se redujo la concentración de PLA respecto al experimento anterior hasta un 4.5 % y se modificaron las proporciones del disolvente, quedando la relación DMAc/Acetona en 8:2. Con un caudal de 0,7 ml/h, una altura TTC de 22 cm y una tensión aplicada de 18 kv, se obtuvieron partículas secas. Se recogió una muestra de la huella formada para su posterior visualización y caracterización en el SEM del SCAI de la UMA. En la figura 3.3 se puede observar la forma de las partículas recogidas en esta muestra. Se puede observar de manera clara la forma esférica de las partículas. En la figura 3.2(c) se puede observar que un proceso de electrospinning está cercana a su inicio ya que el inicio de la formación de fibras es apreciable.

Experimento 6

Se quiso probar un polímero diferente, por lo que se preparó una disolución de PCL 5 % en cloroformo en un volumen total de 20 ml. Disolvente. Estableciendo una distancia TTC de 13 cm, un voltaje aplicado de 17 kV y un caudal de 0.5 ml/h, no se obtuvo una estructura estable, duradera en el tiempo, del cono de Taylor.

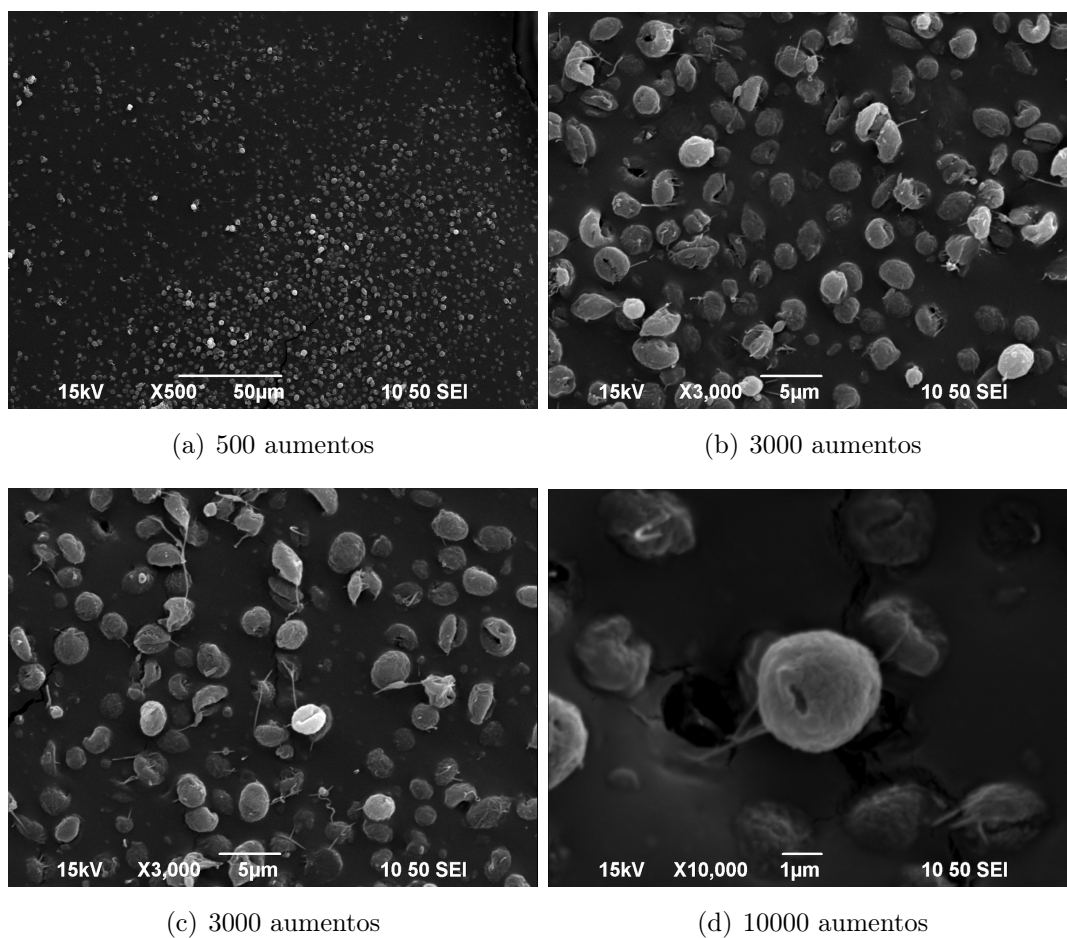


Figura 3.3: Partículas poliméricas vistas con el SEM tras la realización del experimento 5 a diferentes aumentos

Experimento 6.1

Se redujo el caudal a 0,3 ml/h y se obtuvo una formación de cono muy estable, pero las partículas llegaron mojadas y no se recogió muestra.

Experimento 6.2

Para corregir este efecto, se incrementó la distancia TTC hasta un valor de 24,5 cm y el caudal se mantuvo en 0,3 ml/h. Aplicando un voltaje aplicado de 10 kV, se formó un cono de Taylor estable, que empezó a solidificarse a partir de los 10 minutos. Las partículas que se depositaron llegaron secas, por lo que se recogió muestra de la huella para su visualización y caracterización. En la figura 3.4 se puede observar la morfología de las partículas de la muestra recogida.

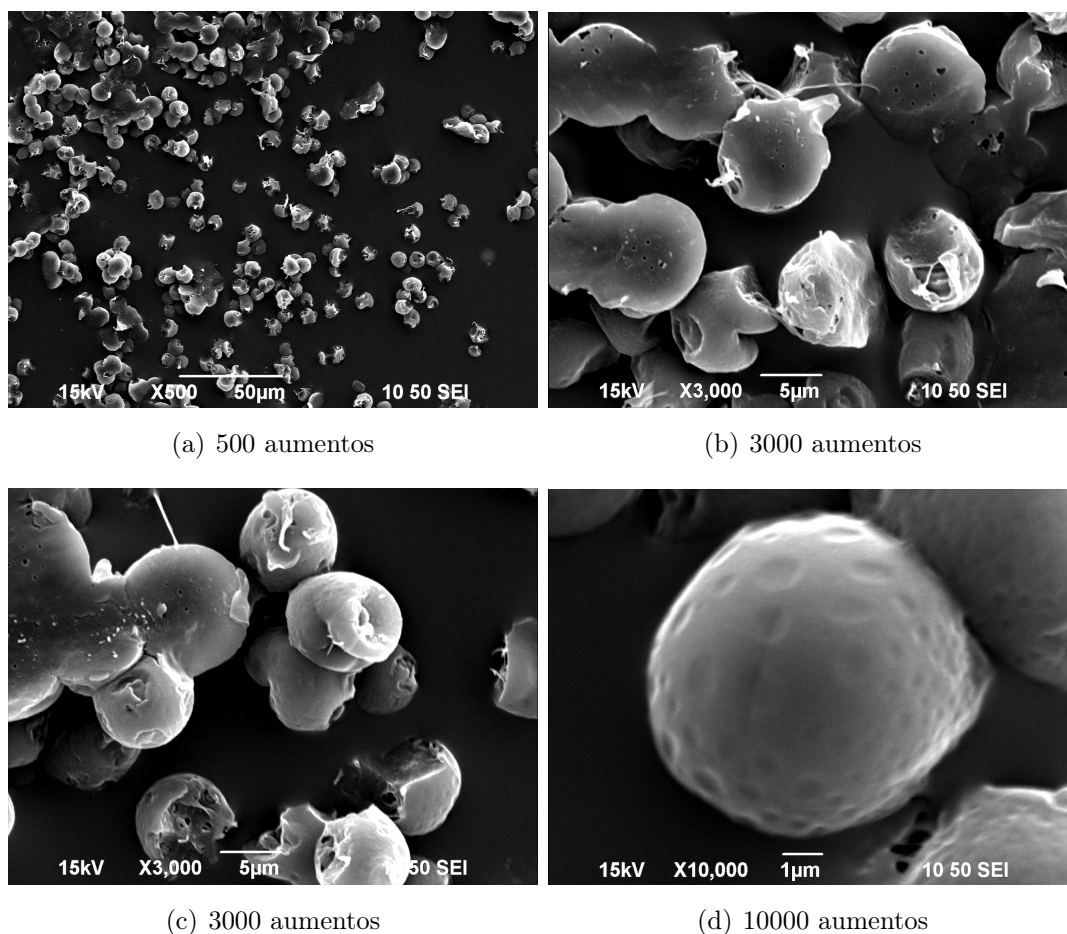


Figura 3.4: Imágenes tomadas con el SEM de las partículas obtenidas tras realizar el experimento No. 6.2 con un caudal de 1.2 ml/h a diferentes aumentos

Ante el éxito de obtención de partículas, se modificaron los valores de los parámetros de caudal y tensión, dejando fija la distancia TTC, para obtener otras muestras y estudiar su influencia en la formación de las partículas:

- Caudal de 0,3 ml/h, tensión de 10 kV.
- Caudal de 0,6 ml/h, tensión de 10 kV.
- Caudal de 1 ml/h, tensión de 10 kV.
- Caudal de 1,2 ml/h, tensión de 11 kV.

Experimento 7

Como un objetivo a alcanzar a medio-largo plazo de esta línea de trabajo es la encapsulación de péptidos, como la GAL, que estarían disueltos en LCR, se comprobó si éste forma por sí solo un cono de Taylor. No se obtuvo ninguna combinación de parámetros que resultara en una formación estable de cono de Taylor. Es importante destacar que el LCR es en gran parte agua, y que el agua no forma cono de Taylor debido a su gran tensión superficial. Por tanto, este hecho dificulta el proceso de encapsulación. No obstante, esto no es definitivo ya que el cono coaxial que se montará estará determinado en última instancia por la disolución que se sitúe en el exterior en la configuración coaxial, porque

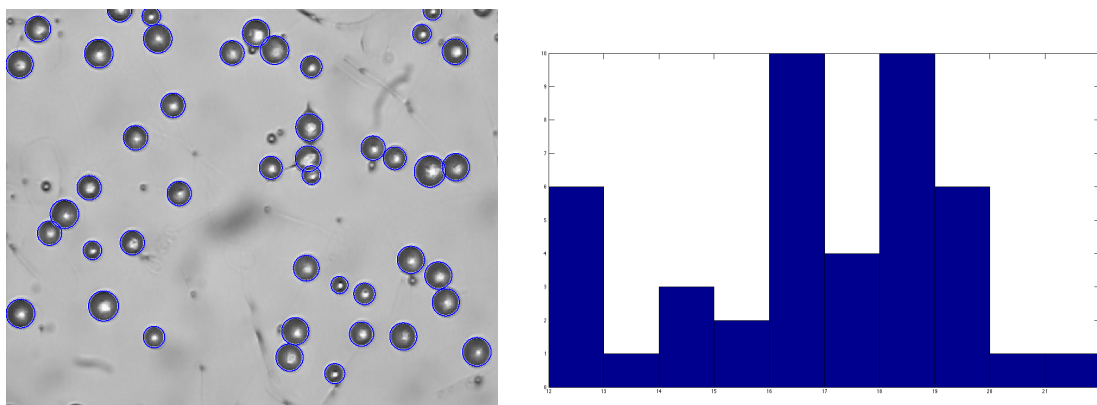
Tabla 3.2: Tabla resumen de los experimentos que se hicieron para la obtención de partículas poliméricas. * Valores de caudales de 0,3 ml/h; 0,6 ml/h; 1 ml/h; 1,2 ml/h

Experimento No.	Disolvente	Solución	Caudal	Voltaje (kV)	TTC (cm)
1	DCM	PLA (3 %)	-	-	-
2	DMAc	PLA (5 %)	0,5	13	20
3	DMAc	PLA (5 %)	0,2	15	20
3.1	DMAc	PLA (5 %)	0,5	13	25,5
4	DMAc, Acetona (7,5:2,5)	PLA (7 %)	0,9	16	22
5	DMAc, Acetona (8:2)	PLA (4,5 %)	0,7	18	22
6	Cloroformo	PCL (5 %)	0,5	15	13
6.1	Cloroformo	PCL (5 %)	0,3	10	13
6.2	Cloroformo	PCL (5 %)	*	10	24,5
7	Agua	LCR	1	15	15

ésta será la que *arrastre* al líquido interior.

Tras la aplicación del algoritmo de detección de la forma circular de las partículas, ejecutado con una fotografía tomada a una muestra de PCL 5 % en cloroformo, en la figura 3.5(a) se aprecia el contorno de las partículas, que describe una esfera casi perfecta.

Como se observa en la figura 3.5(b), las partículas con mayor frecuencia de aparición para este caso son las que poseen un radio (en píxeles) entre 17 y 19 píxeles.



(a) Partículas vistas al microscopio óptico (b) Histograma en el que se representa la frecuencia con borde azul tras ser detectadas como circulares (eje y) con la que aparecen las partículas de un determinado radio en píxeles (eje x)

Figura 3.5: Resultado tras aplicar el algoritmo para detectar círculos

Tabla 3.3: Tabla resumen de las muestras de partículas poliméricas obtenidas

Muestra No.	Disolvente	Solución	Caudal(ml/h)	Voltaje (kV)	TTC(cm)	diámetro partícula(μm)
1	Cloroformo	PCL (5 %)	0,3	10	24,5	$3,18 \pm 0,53$
2	Cloroformo	PCL (5 %)	0,6	10	24,5	$5,48 \pm 0,56$
3	Cloroformo	PCL (5 %)	1	10	24,5	$7,85 \pm 0,89$
4	Cloroformo	PCL (5 %)	1,2	11	24,5	$8,37 \pm 0,79$
5	DMAc, Acetona (8:2)	PLA (4,5 %)	1	18,5	22	$2,37 \pm 0,14$
6	DMAc, Acetona (8:2)	PLA (4,5 %)	0,7	16,5	22	$2,52 \pm 0,29$
7	DMAc, Acetona (8:2)	PLA (4 %)	1	16	22	$3,01 \pm 0,63$

3.2.2. Discusión

Los tamaños de todas las partículas obtenidas tras la realización de los experimentos son del orden de micras (μm), tal y como se observa en la tabla 3.3.

Las diferencias principales entre estos tamaños se deben fundamentalmente al cambio de material y de disolvente empleados, y, en menor medida, a la variación de los parámetros que se hicieron durante los distintos experimentos.

En cuanto a tamaño y a morfología, la muestra que arrojó mejores resultados fue la muestra 6 (Tabla 3.3), tal y como observa en la Figura 3.3, siendo las partículas obtenidas uniformemente esféricas y con tamaños entre 2 y 3 μm (Tabla 3.3) No obstante, tal y como se mencionó en secciones anteriores, el tamaño medio de los fármacos que consiguen acceder al SNC es del orden de nm, por tanto el tamaño de estas partículas está aún lejos del tamaño deseado.

La concentración de polímero juega un papel fundamental en el tamaño y morfología de las partículas. La formación de fibras apareció en algunas muestras de las analizadas, ello indica que un proceso de electrospinning se había producido. Esto ocurrió en las muestras que contenían una mayor concentración de polímero, como se ha explicado en el experimento 4 (Tabla 3.2)

Por otro lado, analizando las muestras 1, 2, 3 y 4 (Tabla 3.3), sus principales diferencias, en cuanto a los parámetros utilizados, están en los caudales. Ello resulta en una diferencia del tamaño bastante importante. Por tanto, se puede apreciar de manera muy clara que el caudal y el diámetro de la partícula están directamente relacionados.

Por último, es necesario mencionar el hecho de que muchas de las partículas observadas con el SEM tienen una particularidad, al aplicarles la corriente necesaria para verlas se rompen. Es por ello, que su aspecto en muchas ocasiones no es uniforme. Como se puede ver en la figura 3.5(a), el microscopio óptico permite ver de manera más clara la morfología de la partícula, aunque se pierde capacidad de ver el relieve de la misma.

3.3. Generación de cápsulas

Una vez completada la fase de generación de partículas, el objetivo se centró en conseguir encapsular LCRa con esas partículas obtenidas.

La estructura con la que se trabaja en el proceso de Electrospraying coaxial es muy similar a la del proceso Electrospraying simple. La principal diferencia radica en el uso de un inyector coaxial, por el que discurre un capilar (diámetro menor) dentro de otro (diámetro mayor). Por cada capilar circula cada uno de los líquidos, el líquido interior, circulando por el capilar de diámetro menor, será el que se encapsule dentro del líquido exterior, circulando por el capilar de diámetro mayor. Puesto que se usan dos líquidos, fue necesario el uso de bombas, uno para cada líquido impulsado.

Para la fase de generación de cápsulas se eligieron las muestras de partículas que ofrecieron un mejor resultado, en cuanto a forma y tamaño. Por tanto, se decidió escoger para tomar, así, como base de las cápsulas las partículas de la muestra 3, para el caso del PCL, y la muestra 6, para el caso del PLA (Tabla 3.3).

En todos los experimentos llevados a cabo, la disolución interior consistió en la solución de LCRa tintada con azul de metileno. El caudal de esta disolución siempre será menor que el caudal de la disolución exterior, pues ésta será la que *arrastre* a la primera, formando así un cono de Taylor coaxial.

3.3.1. Experimentación

Los experimentos llevados a cabo para la obtención de las cápsulas poliméricas se resumen en la Tabla 3.4. Se tendrá en cuenta que la distancia TTC en todos los experimentos se fijó en 22 cm.

Experimento 1

Se empezó probando las partículas de la muestra 6 (Tabla 3.3). El líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) fue utilizado como disolución interior, pues es lo que se desea encapsular. A una altura de 22 cm, un voltaje de 17 kV y una relación de caudales de 3 ml/h (disolución exterior) y 2 ml/h (disolución interior) no se obtuvieron resultados positivos. No se formaba la estructura de cono de Taylor coaxial estable en ningún momento.

Experimento 2

A continuación, se mantuvieron los parámetros del experimento anterior, pero usando un caudal interior mucho menor, que se fijó en 0.5 ml/h, pues el dripping de la disolución interior era bastante apreciable. El dripping es el efecto que consiste en el goteo constante del cono. No se consiguieron resultados positivos .

Tabla 3.4: Tabla resumen de los experimentos realizados para la encapsulación del LCR

Experimento No.	líquido exterior	líquido interior	Caudal exterior(ml/h)	Caudal interior(ml/h)	Voltaje (kV)	TTC (cm)
1	DMAc, Acetona (8:2), PLA (4,5 %)	LCR tintado	3	2	17	22
2	DMAc, Acetona (8:2), PLA (4,5 %)	LCR tintado	3	0,5	17	22
3	Cloroformo, PCL(5 %)	LCR tintado	2	0,01	12	22
4	Cloroformo, PCL(3 %)	LCR tintado	2	0,01	15	22
5	Cloroformo, PCL(2 %)	LCR tintado	5	1	15	22
6	Cloroformo, PCL(2 %), SPAN80(0,5 %)	LCR tintado	5	1	15	22
7	Cloroformo, PCL(2 %), SPAN80(0,5 %), glucosa (50 %)	LCR tintado	9	1	15	22
8	Cloroformo, PCL(2 %), SPAN80(0,5 %), glucosa (50 %)	LCR tintado	9	0,9	15	22

Tras estos intentos fallidos, se sugirió la posibilidad de que los líquidos no fuesen inmiscibles, condición indispensable para el Electrospraying coaxial. Por tanto, se midió la tensión interfacial entre ambos líquidos usando un tensiómetro mediante el método del anillo, que resultó tener un valor de 18 mN/m. Sin embargo, al medir este valor, se detectó otro problema. Una capa superficial sólida era apreciable, consistía en una tela producida por el contacto alargado en el tiempo de las dos disoluciones. Se debe destacar que este hecho no consiguió resolverse de manera positiva en ningún momento, aunque sí se consiguió retrasar su aparición mediante un mayor tiempo de mezclado. El tiempo máximo de retraso fue de 10 minutos, por tanto, este es el tiempo que se dispondría antes de que el cono se seque, antes de que se dé esta indeseada interacción y no se pueda formar una estructura estable.

Experimento 3

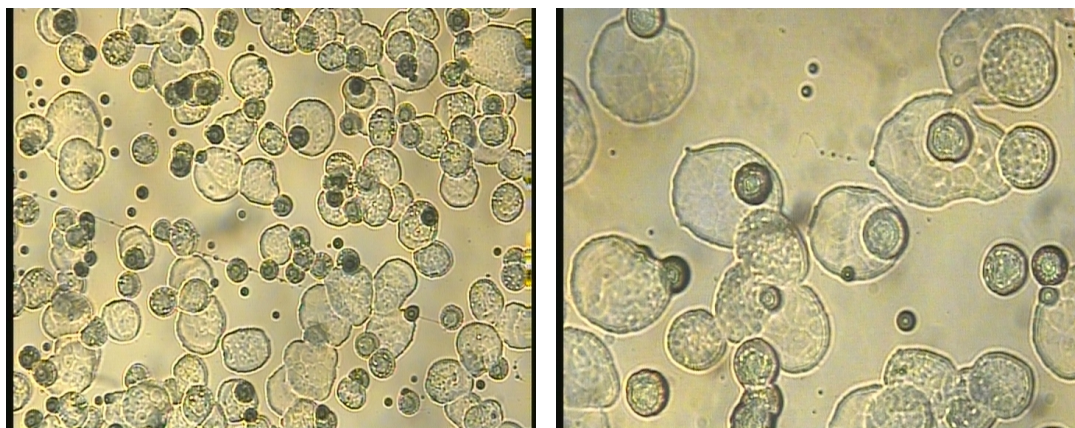
Se decidió cambiar de polímero y se trabajó con la muestra 4 (Tabla 3.3), de PCL. La relación de caudales usada para este experimento fue de 2 ml/h exterior y 0.01 ml/h interior. La distancia TTC se fijó a 22 cm, y el voltaje aplicado fue de 12 kv. Los resultados obtenidos no fueron positivos ya que el cono se secaba nada más iniciar el experimento.

Experimento 4

Tras los resultados fallidos del experimento 3, se decidió reducir la concentración de PCL al 3 %, reduciéndose así la viscosidad, y mantener el resto de parámetros constantes. Se obtuvieron resultados mejores, pero el cono de Taylor aún seguía sin ser del todo estable y se secaba con facilidad al poco tiempo de su formación.

Experimento 5

En este experimento, se bajó la concentración de la disolución de PCL hasta el 2 %, la relación de caudales usada fue de 5 ml/h en el exterior y 1 ml/h en el interior. Esto arrojó buenos resultados, el cono ya no se secaba con tanta facilidad, aunque el efecto dripping siguió apareciendo, es decir, el LCR tintado seguía goteando con mucha facilidad y cada vez que se formaba una gota esta caía por su propio peso. Por inestabilidades propias del proceso, se pudo observar cómo en cierto punto del proceso, la formación de gotas dió paso a la formación de un chorro y, por tanto, se inició un proceso de Electrospinning, es decir, de formación de fibras.



(a) Cápsulas poliméricas de LCR. 20 aumentos (b) Cápsulas poliméricas de LCR. 40 aumentos

Figura 3.6: Cápsulas poliméricas vistas a microscopio óptico tras la realización del experimento No.8

Experimento 6

Se añadió al líquido un tensioactivo, el *SPAN80*, con el objetivo de reducir la tensión interfacial entre ambos líquidos y hacer reducir el esfuerzo que hay que realizar para montar el cono de Taylor, intentando radicar así la aparición del efecto dripping. La concentración de *SPAN 80* utilizada fue de 0,5 %. La relación de caudales siguió siendo igual al experimento anterior, y el voltaje aplicado de 15 kv. Los resultados no fueron positivos, el efecto dripping seguía apareciendo.

Experimento 7

Para seguir disminuyendo el efecto dripping, se le decidió aumentar la viscosidad al LCR. La forma en que se aumentó la viscosidad al LCR fue añadiéndole glucosa, en una concentración del 50 %. Tras realizar varias pruebas con este experimento, la única prueba que arrojó mejores datos fue la probada con la relación de caudales de 9 ml/h en la disolución exterior y 1 ml/h en la disolución interior. El voltaje aplicado fue de 15 kv. Ello resultó en mejores resultados y se consiguió encapsular de manera parcial el LCR.

Experimento 8

Pese a que el experimento 7 mostró resultados positivos, el goteo en el proceso era apreciable (efecto dripping), por tanto, se disminuyó minimamente el caudal de la disolución interior hasta un valor de 0,9 ml/h, manteniendo constante el resto de parámetros respecto al anterior experimento. Se recogió una muestra tras la realización de este experimento para su observación. Los resultados gráficos de dicha muestra se observan en la figura 3.6.

En la figura 3.6, se pueden ver dos imágenes, a distintos aumentos, de cápsulas poliméricas. Se puede observar como unas estructuras circulares claras, que se corresponden con las partículas poliméricas conseguidas a partir del Electrospraying de la disolución

exterior, rodean a otras más oscuras de menor tamaño que se corresponden con las partículas de LCR, conseguidas a partir del Electro spraying de la disolución interior.

Tras ejecutar el algoritmo del cálculo de la conductividad eléctrica comentado en el apartado 3.1.6. resultó un valor de $0.00104 \pm 4,523 \cdot 10^{-5} \text{ S/m}$, como se puede ver en la figura 3.7.

Debido a la baja eficiencia de encapsulación, no se procedió a la caracterización de las cápsulas resultantes.

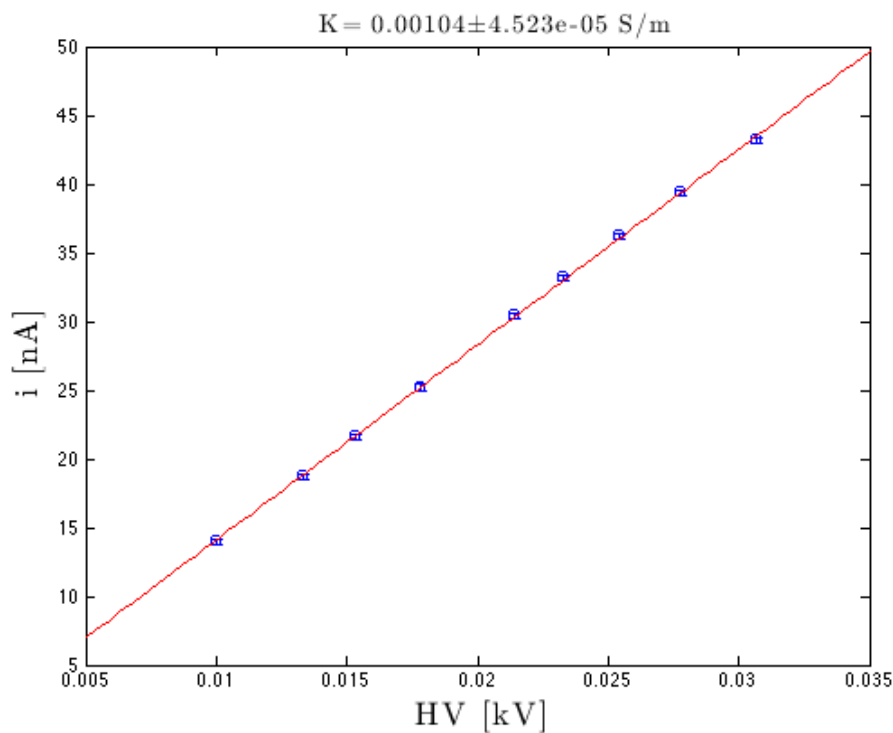


Figura 3.7: Resultado obtenido tras interpolar el valor de la conductividad. Se incluye la medida del error.

3.3.2. Discusión

Tras la realización del experimento de medida de la conductividad, se concluye que se trata de un valor pequeño de conductividad eléctrica. Además, como se observa en la figura 3.7, el error de la medida es muy pequeño. Por tanto, se puede afirmar que se trata de una medida muy precisa. Pese a que una conductividad mayor favorece la obtención de tamaños de partículas menores, resultó positivo el valor obtenido porque para valores grandes de conductividad la relación de caudales con la que se trabaja es menor, y las bombas de las que se disponía no alcanzarían caudales del orden menor de 0,01 ml/h.

No obstante, se puede observar como la eficiencia de encapsulación es baja ya que únicamente una pequeña parte de las partículas poliméricas encapsula a las partículas de

LCR, por lo que se puede concluir que el proceso de Electrospraying coaxial no ha sido del todo eficaz. Ello se debe a que el proceso en ningún momento se consiguió hacerlo estable, surgiendo distintos problemas, como los mencionados en la sección de experimentación.

Tras la realización de los primeros experimentos de Electrospraying con el LCRA, líquido de base acuosa, no se conseguía formar cono de Taylor. Este suceso fue solucionado mediante la adición de azúcar al LCRA para así aumentar su viscosidad y reducir el efecto dripping, consiguiendo así una estructura de cono de Taylor, aunque no duradera en el tiempo.

Capítulo 4

Conclusiones

Se han extraído las siguientes conclusiones tras la realización del presente trabajo de fin de grado.

- Ha sido demostrada la capacidad de la técnica de electrospraying para producir partículas de tamaño micrométrico.
- Modificando las distintas variables del proceso, tales como caudal, conductividad, voltaje aplicado, o distancia TTC se puede variar el tamaño de partícula. No obstante, no se ha conseguido sintetizar partículas del tamaño deseado, del orden de nanómetros.
- La utilidad del PLA y PCL para producir partículas de diferente tamaño y morfología con la técnica de electrospraying.
- La utilización del LCR como medio acuoso en el que disolver los fármacos y neuropeptidos dificulta en gran manera su encapsulación.
- La adición de glucosa al LCRA, aumentando así su viscosidad, para la obtención de cápsulas poliméricas.

Capítulo 5

Líneas futuras de trabajo

Se proponen las siguientes líneas de trabajo futuras tras la realización del presente trabajo de fin de grado:

- Reducción del tamaño de las partículas obtenidas en el presente trabajo, acompañado de un estudio de la conductividad de todas las disoluciones utilizadas, pues es el parámetro que, en primera instancia, determina el tamaño de la partícula.
- Llevar a cabo el proceso de electrospraying con diferentes materiales a los usados, tales como el PLGA. Primero, se deberá analizar el tamaño de las partículas resultantes. Posteriormente, Se deberá analizar la eficiencia de encapsulación y compararla con los resultados obtenidos en este trabajo.
- Realización de pruebas *in vitro* (cultivos celulares) para comprobar el rendimiento in vivo de las cápsulas aportadas, a través de la liberación controlada del fármaco contenido.
- Estudio acerca de la influencia que tiene la adición de glucosa en el LCR.

Capítulo 6

Bibliografía

- Abbott, N. J. and Friedman, A. (2012). Overview and introduction: the blood–brain barrier in health and disease. *Epilepsia*, 53(s6):1–6.
- Abbott, N. J., Rönnebeck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1):41–53.
- Adrian, T., Allen, J., Bloom, S., Ghatei, M., Rossor, M., Roberts, G., Crow, T., Tate-moto, K., and Polak, J. (1983). Neuropeptide y distribution in human brain. *Nature*, 306(5943):584–586.
- Azad, T. D., Pan, J., Connolly, I. D., Remington, A., Wilson, C. M., and Grant, G. A. (2015). Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. *Neurosurgical focus*, 38(3):E9.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16(1):1–13.
- Barde, S., Rüegg, J., Prud’homme, J., Ekström, T. J., Palkovits, M., Turecki, G., Bagdy, G., Ihnatko, R., Theodorsson, E., Juhasz, G., et al. (2016). Alterations in the neuropeptide galanin system in major depressive disorder involve levels of transcripts, methylation, and peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(52):E8472–E8481.
- Bock, N., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., and Dargaville, T. R. (2011). Electrospraying, a reproducible method for production of polymeric microspheres for biomedical applications. *Polymers*, 3(1):131–149.
- Brasnjevic, I., Steinbusch, H. W., Schmitz, C., Martinez-Martinez, P., Initiative, E. N. R., et al. (2009). Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier. *Progress in neurobiology*, 87(4):212–251.
- Broadwell, R. D., Baker-Cairns, B. J., Friden, P. M., Oliver, C., and Villegas, J. C. (1996). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium: Iii. receptor-mediated transcytosis through the blood–brain barrier of blood-

- borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Experimental neurology*, 142(1):47–65.
- Burbach, J. (2011). Neuropeptides: Methods and protocols.
- Chen, D.-R. and Pui, D. Y. (1997). Experimental investigation of scaling laws for electrospraying: dielectric constant effect. *Aerosol Science and Technology*, 27(3):367–380.
- de Boer, A. G. and Gaillard, P. J. (2006). Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *Journal of Neural Transmission*, 113(4):455–462.
- De La Mora, J. F. and Loscertales, I. G. (1994). The current emitted by highly conducting taylor cones. *Journal of Fluid Mechanics*, 260:155–184.
- Enayati, M., Chang, M.-W., Bragman, F., Edirisinghe, M., and Stride, E. (2011). Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 382(1):154–164.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology*, 130(1):55–70.
- Holmes, A. and Picciotto, M. (2006). Galanin: a novel therapeutic target for depression, anxiety disorders and drug addiction? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 5(2):225–232.
- Jain, K. (2013). Role of biotechnology in drug delivery to the nervous system. *Humana press*, 43(7):477–511.
- Janzer, R. (1993). The blood-brain barrier: cellular basis. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(4):639–647.
- Jaworek, A. (2007). Micro-and nanoparticle production by electrospraying. *Powder technology*, 176(1):18–35.
- Kapoor, D. N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., and Dhawan, S. (2015). Plga: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic delivery*, 6(1):41–58.
- Lalatsa, A. and Barbu, E. (2016). Carbohydrate nanoparticles for brain delivery. *International review of neurobiology*, 130:115–153.
- Loch-Neckel, G. and Koepp, J. (2010). The blood-brain barrier and drug delivery in the central nervous system. *Rev Neurol*, 51(3):165–74.
- Lundström, L., Elmquist, A., Bartfai, T., and Langel, Ü. (2005). Galanin and its receptors in neurological disorders. *Neuromolecular medicine*, 7(1-2):157–180.
- Makadia, H. K. and Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (plga) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3):1377–1397.

- Millón Peñuela, C. (2015). Interacciones entre la galanina (1-15) y los receptores serotoninérgicos 5ht1a en el sistema nervioso central: Implicación en la depresión.
- Mitsukawa, K., Lu, X., and Bartfai, T. (2008). Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(12):1796–1805.
- Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1):3–14.
- Park, C. H. and Lee, J. (2009). Electrosprayed polymer particles: effect of the solvent properties. *Journal of applied polymer science*, 114(1):430–437.
- Pascual, G. J., González, L. F., Prieto, A. R., Cerdan, S., and Roda, J. (2003). Blood brain barrier: development of a structure which supports the functional heterogeneity of the central nervous system. *Revista de neurologia*, 38(6):565–581.
- Sakka, L., Coll, G., and Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*, 128(6):309–316.
- Shilo, M., Sharon, A., Baranes, K., Motiei, M., Lellouche, J.-P. M., and Popovtzer, R. (2015). The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an in-vitro endothelial cell model. *Journal of nanobiotechnology*, 13(1):19.
- Sun, Y., Kang, C., Liu, F., and Song, L. (2016). Delivery of antipsychotics with nanoparticles. *Drug Development Research*, 77(7):393–399.
- Tam, V. H., Sosa, C., Liu, R., Yao, N., and Priestley, R. D. (2016). Nanomedicine as a non-invasive strategy for drug delivery across the blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1):331–342.
- Trono, J. D., Mizuno, K., Yusa, N., Matsukawa, T., Yokoyama, K., and Uesaka, M. (2011). Size, concentration and incubation time dependence of gold nanoparticle uptake into pancreas cancer cells and its future application to x-ray drug delivery system. *Journal of radiation research*, 52(1):103–109.
- Wolburg, H. and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology*, 38(6):323–337.
- Xu, Y., Skotak, M., and Hanna, M. (2006). Electrospray encapsulation of water-soluble protein with polylactide. i. effects of formulations and process on morphology and particle size. *Journal of microencapsulation*, 23(1):69–78.
- Zamani, M., Prabhakaran, M. P., and Ramakrishna, S. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *Int J Nanomedicine*, 8(1):2997–3017.

Anexo I. Códigos de MATLAB

Código para la detección de partículas circulares

```
1  %% Algoritmo de detección de círculos
2  % a través de la transformada de Hough
3  %Autor:Adrián Postigo Arrabal
4  %Grado en Ing. Salud- Mención Biomédica
5
6  % 1 - Recortar la imagen
7  % (pinchando en dos puntos correspondientes a esquinas opuestas)
8  % 2 - Seleccionar el diámetro de esfera mínimo
9  % (pinchando dos veces tras zoom)
10 % 3 - Seleccionar el diámetro de esfera máximo
11 % (pinchando dos veces tras zoom)
12
13 function circleDet
14 % Entrada de datos
15 correcto=false;
16 defaultanswer={'jpg','0.95','bright'};
17 while ~correcto
18     prompt={'Image extension:',...
19           'Sensitivity [0,..1]:','Polarity [bright/dark]:'};
20     name='Input parameters';
21     numlines=1;
22     answer=inputdlg(prompt,name,numlines,defaultanswer);
23     extension=answer{1};
24     sens=str2double(answer{2});
25     pol=answer{3};
26     defaultanswer=answer;
27
28     correcto=true;
29     if ~(strcmp(pol,'bright') || strcmp(pol,'dark')), correcto=false; end
30     if (sens>1 || sens<0), correcto=false; end
31 end
```

```

32 % Lectura del archivo
33 if ~ispref('misPreferencias','pathname');
34     addpref('misPreferencias','pathname','');
35 end
36
37 pathname=getpref('misPreferencias','pathname');
38 if pathname==0
39     setpref('misPreferencias','pathname','');
40     pathname=getpref('misPreferencias','pathname');
41 end
42 [filename,pathname] = uigetfile(['*.',extension],...
43     'seleccionar imagen',pathname);
44 setpref('misPreferencias','pathname',pathname);
45 im = imread([pathname,filename]);
46 if size(im,3)>1, im=rgb2gray(im); end
47
48 % Recortar imagen
49 hf=figure('color','w'); imshow(im)
50 [x,y]=ginput(2);
51 x=round(x); y=round(y);
52 im=im(y(1):y(end),x(1):x(end));
53 close(hf)
54
55 % Elegir Radios mínimo y máximo
56 hf1=figure('color','w'); imshow(im)
57 zoom, pause, [x,y] = ginput(2);
58 Rmin=round(sqrt(diff(x)^2+diff(y)^2)/2);
59 zoom, pause, [x,y] = ginput(2);
60 Rmax=round(sqrt(diff(x)^2+diff(y)^2)/2);
61
62 % Transformada de Hough
63 [centers, radii] = imfindcircles(im,[Rmin Rmax],...
64     'ObjectPolarity',pol,'Sensitivity',sens,'method','TwoStage');
65 zoom out
66 viscircles(centers, radii,'EdgeColor','b');
67 figure('color','w'), hist(radii)
68
69 % Guardar resultados
70 save([pathname,filename(1:end-4)], 'radii')
71 savefig(hf1,[pathname,filename(1:end-4)])

```

Código para el cálculo de la conductividad eléctrica

```
1 %% Algoritmo del cálculo de la conductividad eléctrica
2 %Autor:Adrián Postigo Arrabal- Grado en Ing.Salud. Mención Biomédica
3
4 HV=[10 13.3 15.3 17.8 21.4 23.3 25.4 27.8 30.7]; % Voltaje aplicado
5 HVE=0.1*ones(size(HV));
6 u=[14 18.7 21.6 25.2 30.4 33.2 36.2 39.4 43.2]*1e-3; % voltaje
7 %medido en resistencia Rp
8 uE=0.2*1e-3*ones(size(u));
9 L=57.7e-2; % longitud tubo
10 LE=2e-3;
11 di=1e-3; % diámetro interior tubo
12 dE=20e-6;
13 Rp=1e6; % Resistencia voltímetro
14 i=u/Rp; % intensidad
15 iE=uE/Rp;
16 R=HV./i-Rp; % Resistencia en el tubo
17 RE=HVE./(i-Rp)+iE.*HV./i.^2.*iE;
18 k=4*L./(R*pi*di^2); % conductividad
19 kE=4*LE./(R*pi*di^2)+4*RE.*L./(R.^2*pi*di^2)+8*dE.*L./(R*pi*di^3);
20 txt=['K= ', num2str(k,4), ' S/m'];
21 disp('_____')
22 disp(txt)
23
24 figure('color','w')
25 errorbar(HV/1e3,i*1e9,iE*1e9,'bo')
26 xlabel('HV [kV]','interpreter','latex','fontsize',18)
27 ylabel('i [nA]','interpreter','latex','fontsize',18)
28
29 xlim=get(gca,'xlim');
30 xx=linspace(xlim(1),xlim(2),100);
31 p=polyfit(HV/1e3,i*1e9,1);
32 hold on
33 plot(xx,polyval(p,xx),'r-')
34 txt=['K= ', num2str(mean(k),4), '\pm', num2str(mean(kE),4), ' S/m'];
35 title(txt,'interpreter','latex','fontsize',14)
```